

ANNALES

DE

L'INSTITUT PASTEUR

ACTION DE PRODUITS MITOSTATIQUES DE SYNTHÈSE SUR LE « CROWN GALL »

par PAUL MANIL et JEAN FOURNEAU (*).

(Institut agronomique de l'Etat, Gembloux, Belgique)

Comme on le sait, en raison de certaines de ses analogies avec le cancer animal, le « crown-gall », provoqué par *Agrobacterium tumefaciens*, est étudié de façon opiniâtre dans maints laboratoires.

Bien que la question reste controversée, il semble bien que ces analogies justifient l'appellation de « cancer végétal », souvent utilisée pour le « crown-gall ».

La présente recherche fait suite à des travaux similaires portant sur l'action inhibitrice exercée sur le « crown-gall » par l'aminoptérine [1], le thiouracile [2], la mercaptoéthylamine [3].

L'effet de cinq autres composés faisant l'objet de recherches en cancérologie animale a été étudié sur le « crown-gall ».

(*) *Société Française de Microbiologie*, séance du 1^{er} décembre 1955.

(**) Travail effectué sous les auspices du Centre interuniversitaire de Recherches sur la Croissance normale et pathologique.

ACTION SUR « AGROBACTERIUM TUMEFACIENS ».

Le milieu suivant fut coulé en plaques de Petri :

Mannite	10 g
Na Cl	0,2 g
K ₂ HPO ₄	0,5 g
Mg SO ₄ . 7 H ₂ O	0,2 g
Ca SO ₄ . 2 H ₂ O	0,1 g
Ca CO ₃	0,1 g
Eau de levure	100 cm ³
Eau distillée	900 cm ³
Gélose	15 g

Les boîtes de Petri furent ensuiteensemencées d'*Agrobacterium tumefaciens*. Après refroidissement, furent déposés à leur surface des disques de papier-filtre de 1 cm de diamètre, préalablement imprégnés de solutions, différemment concentrées, des produits à l'étude. Deux boîtes furent réservées à chaque produit. Chaque boîte contenait trois disques : le premier imprégné d'eau, les deux autres contenant les produits aux concentrations suivantes : 1 g/litre ; 0,1 g/litre.

Tous ces essais donnèrent des résultats absolument négatifs : on n'observe, dans les conditions de nos essais, ni une action inhibitrice, ni une action favorable. Ces produits n'ont donc aucune action décelable sur *Agrobacterium tumefaciens*.

En conclusion, des résultats positifs éventuels sur le « crown-gall » ne pourront être attribués à une action des produits sur la bactérie elle-même. Ces produits, pourrait-on objecter, exercent peut-être une activité mutagène. Mais, dans les conditions des essais ultérieurs (l'inoculum contenant au moins quelques milliers de bactéries), la chose n'est pas à prendre en considération.

ESSAIS SUR LE « CROWN-GALL ».

Ces essais furent répartis en deux groupes, selon que les produits furent appliqués sur des tumeurs d'un certain âge, ou que le traitement débuta au moment même de l'inoculation.

I. ESSAI SUR DES TUMEURS EN CROISSANCE. — Vingt-cinq tournesols (*Helianthus annuus*) furent inoculés en trois points des tiges, au moyen d'une suspension dense d'*Agrobacterium tumefaciens*.

Quatre semaines plus tard, les tumeurs ayant environ 1 cm de diamètre furent traitées selon la méthode suivante : chaque tumeur fut entourée d'ouate, maintenue au moyen de cellophane. Le tout fut entouré de plasticine afin de réduire le plus possible l'évaporation. L'ouate fut ensuite imprégnée des produits à l'étude, par

l'intermédiaire d'un cylindre en verre inséré au préalable dans l'ouate, et saillant hors de la plasticine.

Ce cylindre, placé en permanence, servira ultérieurement aux réimbibitions ; dans l'intervalle, il fut lui-même bouché à l'aide de plasticine.

Les 25 tournesols furent répartis en cinq groupes de cinq plantes chacun, un groupe pour chaque produit.

Dans chaque groupe, les plantes furent réparties comme suit :

- a) Une plante traitée à l'eau et servant de témoin ;
- b) Deux plantes dont les tumeurs inférieure et supérieure furent traitées par le produit à la concentration de 1/1 000, la tumeur intermédiaire étant traitée à l'eau ;
- c) Deux plantes traitées comme les précédentes, mais avec le produit à la concentration de 1/10 000.

L'ouate fut réimprégnée tous les huit jours, afin d'assurer une action permanente du produit.

Observations. — Le traitement fut interrompu après un mois et les tumeurs furent découvertes. Dans aucun cas, on ne constata une inhibition manifeste et systématique des tumeurs traitées, par rapport aux tumeurs témoins.

On peut donc conclure que, dans les conditions de cet essai, les produits antimitotiques de synthèse n'exercent aucune action sur la croissance des tumeurs de « crown-gall ».

II. ESSAIS SUR L'INDUCTION DES TUMEURS. — A. Des tournesols furent inoculés en trois points de la partie supérieure de leur tige, au moyen d'une suspension dense d'*A. tumefaciens*.

Les points d'inoculation furent traités selon la même méthode et dans le même ordre que les tumeurs en croissance de l'essai précédent, l'inoculation intermédiaire étant traitée à l'eau.

B. Vingt-cinq *Datura stramonium* furent également inoculés en trois points de leur tige au moyen d'une suspension dense d'*A. tumefaciens*.

Ils furent, eux aussi, traités selon la méthode décrite ci-dessus pour les tournesols.

Tant les tournesols que les *Datura* furent traités durant un mois, puis les tiges furent découvertes.

Observations. — Les résultats sont consignés dans le tableau I. En résumé :

1° Le produit 301 n'exerce aucune action sur l'induction et le développement des tumeurs ;

2° Il en est de même pour le produit 323, pour la concentration 1/1 000, sur le tournesol, dans un cas sur deux ;

3° Par contre, les produits 300, 306 et 318 exercent une action très nette :

TABLEAU I. — Action des substances antimitotiques de synthèse sur l'induction des tumeurs de « crown-gall ».

Produit	1/1.000		1/10.000	
	TOURNESOLS	DATURA	TOURNESOLS	DATURA
300	0 + 0	0 + 0	0 + 0	+ (+) +
	0 0 0	0 (+) 0	0 0 0	(+) + (0)
301	+ + +	+ + +	+ + +	+ + + +
	+ + +	+ + +	+ + +	+ + +
306	0 + 0	0 (+) 0	0 + 0	(+) + (+)
	0 + 0	0 (+) 0	0 + 0	(+) (+) (+)
318	0 0 0	0 0 0	0 + +	0 0 0
	0 + 0	0 + 0	0 + +	+ + (+)
323	0 (+) 0	+ + +	+ + +	+ + +
	+ + +	+ + +	+ + +	+ + +

0 : inhibition totale ; (0) : inhibition presque totale.

(+) : action dépressive plus ou moins marquée.

+ : action nulle (tumeurs égales aux témoins).

a) 300. — A 1/1 000 : inhibition totale, tant chez le tournesol que chez *Datura* ; les tumeurs intermédiaires traitées à l'eau étant ou n'étant pas affectées ;

A 1/10 000 : inhibition totale chez le tournesol, partielle chez *Datura*.

b) 306. — A 1/1 000 : inhibition totale, tant chez le tournesol que chez *Datura* (les tumeurs intermédiaires traitées à l'eau n'étant pas affectées chez le tournesol et ne l'étant que partiellement chez *Datura*) ;

A 1/10 000 : inhibition totale chez le tournesol, mais partielle seulement chez *Datura* (tumeurs intermédiaires non affectées chez le tournesol, partiellement affectées chez *Datura*).

c) 318. — A 1/1 000 : inhibition totale, tant chez le tournesol que chez *Datura*, les tumeurs intermédiaires n'apparaissant que dans un cas sur deux chez les deux espèces ;

A 1/10 000 : résultats irréguliers chez les deux espèces : inhibition complète pour une tumeur chez chacun des deux tournesols (les deux autres tumeurs n'étant pas affectées) ; inhibition complète des trois tumeurs chez un *Datura*, une seule tumeur du deuxième *Datura* paraissant partiellement inhibée.

Fait important, les observations faites un mois et demi après l'interruption du traitement ne montraient pas de modifications par rapport aux observations détaillées ci-dessus : en cas d'inhibition totale des processus de tuméfaction, l'action des produits paraît définitive.

RÉSUMÉ ET CONCLUSIONS.

En résumé, les produits antimitotiques de synthèse étudiés dans les présents essais n'exercent, dans les conditions de nos expériences, aucune action sur la croissance des tumeurs d'un certain âge.

Par contre, certains de ces produits provoquent une inhibition complète (le plus souvent) ou tout au moins un ralentissement, plus ou moins prononcé, des processus de tuméfaction.

L'action des produits est fonction :

a) De leur nature : agissent les produits 300, 306 et 318 ;

N'agit pas : 301 ;

N'a agi que dans un seul cas : 323.

b) De leur concentration : les concentrations à l'étude étaient 1/1 000 et 1/10 000 : l'inhibition est toujours complète à 1/1 000, mais à 1/10 000 elle peut ne se manifester que par une dépression plus ou moins prononcée de la tuméfaction.

c) De la nature de l'hôte :

1° De l'espèce : il existe des différences nettes entre l'action sur tournesol et l'action sur *Datura* ;

2° De l'individualité même de la plante-hôte : toutes autres conditions étant égales, on peut noter des réactions quelque peu différentes d'une plante à l'autre.

Deux choses sont donc à noter :

1° Il semble exister certaines corrélations entre l'activité de ces produits sur le cancer animal et l'action observée par nous sur le « crown-gall » : deux des trois produits actifs sont ceux qui donnent la moyenne d'inhibition la plus forte sur le sarcome 180 de la souris ; cependant, le produit 306, très actif sur le « crown-gall », montre à peu près la même activité sur le cancer animal que le produit 301, qui, lui, est tout à fait inactif sur le « crown-gall », dans les conditions de nos essais.

2° L'action de ces produits persiste même lorsqu'on a cessé de les appliquer sur les inoculations. Ce n'est pas le cas de tous les produits inhibiteurs de la tuméfaction chez le « crown-gall » : c'est ainsi que l'action du thiouracile, cependant très nette, ne persiste qu'aussi longtemps que ce produit est appliqué. Dès que cette application cesse, la tuméfaction reprend activement [2].

3° L'action de ces produits ne peut être attribuée à une action directe sur la bactérie responsable de la tuméfaction.

SUMMARY.

1° It appears to exist certain correlations between the activity of the mitostatic substances upon animal cancer and the action observed upon crown-gall : two of the three active compounds are those which give the strongest inhibition mean on mouse sarcoma 180 ; however, the compound 306, very active on crown-gall, exhibits about the same activity on animal cancer as compound 301, which is quite inactive on crown-gall under our experimental conditions.

2° The effect of these compounds persists even after the treatment has been stopped. This is not the case of all the compounds inhibiting crown-gall tumefaction : thus the action of thiouracile, although very definite, only persists as long as the compound is applied ; as soon as the application ceases, active tumefaction starts again.

3° The effect of these compounds cannot be attributed to a direct action upon the bacterium responsible of the tumefaction.

BIBLIOGRAPHIE

- [1] P. MANIL et Z. STRASZEWSKA. *Rev. belge Path. Méd. exp.*, 1952, **22**, 96.
- [2] P. MANIL et J. FOURNEAU. *Bull. Inst. agron. et Sta. Rech. Gembloux*, 1955, **23**, 55.
- [3] P. MANIL. *C. R. Soc. Biol.*, 1954, **148**, 406.

ÉTUDE DES CAUSES DU MAUVAIS FONCTIONNEMENT D'UNE STATION D'ÉPURATION DES EAUX USÉES

par HÉLÈNE WINOGRADSKY et F. TRIOZON (*).

*(Institut Pasteur, Service de M. R. DUJARRIC DE LA RIVIÈRE
et Laboratoire départemental de Chimie et Bactériologie, Mâcon)*

La plupart des travaux récents sur le problème de l'épuration des eaux usées sont orientés vers la recherche du type d'installation le mieux adapté aux conditions environnantes d'une région donnée, le plus rentable et donnant un effluent de la meilleure qualité [4 à 8]. Les études bactériologiques portent, d'une part sur la recherche, dans l'effluent, des germes pathogènes, d'autre part, sur la flore bactérienne hétérotrophe de la station (lits bactériens, filtres, bassins de digestion) [9 à 12]. Nombre de travailleurs recherchent les causes du fonctionnement défectueux du dispositif épurateur : ce mauvais fonctionnement serait dû soit à une aération insuffisante, soit à une surcharge des eaux usées en matières à épurer ; ce sont les analyses chimiques qui le mettent en évidence, essentiellement la mesure de la D. B. O. (1) et le dosage de l'oxygène dissous [13 à 17]. Au cours des dernières années, la présence dans les eaux usées de détersifs à des taux de plus en plus élevés, ainsi que l'effet des antibiotiques sur les populations microbiennes utiles du milieu, ont soulevé de nouveaux problèmes et attiré l'attention des chercheurs [18 à 24].

Le problème qui nous a été soumis concerne le fonctionnement de la Station d'Épuration biologique du Sanatorium interdépartemental de Bergesserin. Cette station a été construite en 1942, d'après des études datant de 1936 ; son fonctionnement a été à peu près normal jusqu'en 1948. Depuis, l'effluent est devenu médiocre, puis franchement mauvais, ne satisfaisant plus aux prescriptions du Conseil Supérieur d'Hygiène et provoquant des plaintes de la part des riverains.

La station fonctionne selon la méthode des boues activées par agitation superficielle ou « Système Simplex », suivi d'une chlo-

(*) *Société Française de Microbiologie*, séance du 1^{er} décembre 1955.

(1) Demande Biochimique d'Oxygène.

ration ; elle est construite selon le système séparatif, les eaux de pluie ne se mêlant pas aux eaux usées.

Ce système comprend essentiellement :

Un « bassin de clarification primaire » :

à sa partie inférieure, les particules solides se sédimentent et tombent dans le bassin de digestion ;

à sa partie supérieure, l'eau ainsi décantée contenant les matières dissoutes et en suspension, s'écoule vers la cellule d'aération.

Un « bassin de digestion » où les particules solides sont « digérées » par fermentation anaérobie, en formant les boues de digestion qui se sédimentent au fur et à mesure. En outre, ce bassin reçoit l'excès des boues d'un bassin de décantation secondaire. Périodiquement, ces boues sont soutirées et envoyées vers des lits de séchage.

Une « cellule d'aération » où les boues sont activées par un apport *supplémentaire d'oxygène atmosphérique*. Ainsi, les microorganismes constituant les boues se développent et se reproduisent plus rapidement en utilisant pour leur métabolisme la dégradation des matières organiques, dissoutes ou en suspension, et l'oxydation de l'ammoniaque. C'est dans la cellule d'aération que l'eau s'épure ; elle s'écoule ensuite dans :

un « bassin de décantation secondaire », qui permet de séparer les boues activées de l'eau épurée. A la sortie, l'eau est chlorée, puis rejetée dans un petit ruisseau.

Notre tâche consistait à rechercher si le mauvais fonctionnement était causé par l'action des antibiotiques et des antiseptiques déversés dans les eaux usées sur les micro-organismes assurant l'épuration, ou s'il était dû à une aération insuffisante ou à une surcharge en matières à épurer.

Notre travail fut divisé en deux parties :

I. — Etude chimique (dosage des matières à épurer).

II. — Etude biologique (la nitrification comme test d'épuration).

I. — ÉTUDE CHIMIQUE.

Demande Biochimique d'Oxygène. — La meilleure mesure pour exprimer la pollution d'un effluent et simultanément le travail à déployer en vue de son épuration est la Demande Biochimique d'Oxygène, ou D. B. O. Ce chiffre représente en milligrammes par litre, la quantité d'oxygène consommé par l'eau usée pour s'auto-épurer pendant une durée déterminée (cinq jours) et à une température donnée (18-20°).

Techniques et méthodes. — On opère avec 1 l d'une dilution convenable de l'eau à analyser avec une eau pure, non javellisée (au 1/20, 1/50, 1/100, ou même au 1/200, selon le cas). Un volume de 500 cm³ est mis à l'obscurité pendant cinq jours. L'oxygène est dosé sur le volume restant immédiatement, et ensuite, sur

celui gardé à l'obscurité à la fin de la période indiquée, en employant la méthode de Winkler [25]. La différence entre les deux résultats, compte tenu de la dilution, représente la Demande Biochimique d'Oxygène de l'eau à l'examen.

Outre la D. B. O., nous avons dosé le pH, les matières organiques, l'azote nitreux, nitrique et ammoniacal, les matières en suspension et l'oxygène dissous dans la cellule d'aération. Les résultats, consignés dans le tableau I, confirment la surcharge en matières à épurer, montrent que le pH de l'effluent est variable

TABLEAU I.

		Dates, Heures et Résultats en mg/l					
<u>EAU BRUTE</u>		9.11.54 10 h.	18.11.54 17 h.	6.12.54 11 h. 19 h.		7.12.54 9 h. 14 h.	
	pH	7,5	6,9	7,1	7,0	7,0	7,6
	D.B.O.	460	450	480	400	500	480
	Matières organiques	35	72	86	60	70	71
	N ammon.	24,4	22	23,6	16,5	25	26
	N nitreux	0	0	0			
	N nitrique	0	0	0			
<u>EAU DECANTÉE</u>							
	pH	7,1					
	D.B.O.	355	300				
	Matières organiques	78	58,4				
	Matières en suspension	170					
	N ammon.	18	16				
	N nitreux	0	0				
	N nitrique	0	0				
<u>EAU ÉPURÉE</u>							
	pH	7,6		7,7			
	D.B.O.	300	320	280			
	Matières en suspension	35		50			
	N ammon.	8,5	12	13,6			
	N nitreux	traces	traces	traces			
	N nitrique	0	0	0			
<u>BASSIN DE DIGESTION</u>							
	Densité des boues en p.p.m. (p.p.m. normal — au dessus de 1,200)	870					
<u>EAU CELLULE D'AÉRATION</u>							
	Oxygène dissous (normal — 2 à 3)	1,12	1,09				
	pH	7,4					

selon les jours et les heures, que l'oxygène dissous est en quantité *insuffisante dans la cellule d'aération*. L'absence d'azote nitreux et nitrique indique que la nitrification n'a pratiquement pas lieu.

En résumé : Population du Sanatorium de Bergesserin : 330 personnes en tout.

Consommation d'eau : 110 à 120 m³ par jour.

La D. B. O. moyenne des échantillons d'eau brute est de l'ordre de 460-480 mg d'oxygène par litre.

Pour vingt-quatre heures la D. B. O. totale de l'effluent est de :
 $470 \times 110\,000 = 51\,700\,000$ mg, soit 51 700 g d'oxygène.

La D. B. O. par jour et par habitant est donc de :

$$\frac{51\,700}{330} = 157 \text{ g d'oxygène.}$$

D'après nos analyses, la D. B. O. moyenne par jour et par habitant est ainsi de l'ordre de 160 g. D'après Imhoff [26], la D. B. O. pour un sanatorium est, en système séparatif :

$$54 \times 1,5 = 81 \text{ g d'oxygène par jour et par habitant.}$$

Ainsi la détermination de la D. B. O. fait apparaître une surcharge considérable en matières à épurer par rapport aux normes. Une enquête rapide nous a montré que cette surcharge provenait essentiellement des cuisines : machines à laver la vaisselle, machines à éplucher les légumes, etc. (2).

II. — ÉTUDE BIOLOGIQUE (nitrification).

Il existe relativement peu de travaux sur la nitrification dans les eaux usées et les boues activées. L'importance de son rôle dans le processus de l'épuration biologique par les boues activées du bassin d'aération a été démontrée par nombre d'auteurs, français et étrangers [27], dans les premières décades du siècle. Quelques formes d'organismes nitrificateurs des boues activées ont été isolées et décrites plus récemment [31, 32]. Leur comportement en milieu défavorable a été étudié [33, 34], étude qui a mis en évidence leur capacité de résistance à ces conditions.

Les données chimiques obtenues par l'un de nous semblaient confirmer notre première supposition, à savoir : que la cause principale du mauvais fonctionnement de la station résidait en une surcharge en matières à épurer et, en conséquence, en une aération insuffisante de la cellule d'aération. Or, les boues activées de cette cellule sont le siège de la nitrification, processus aérobic ; comme nous savions, que la formation des boues était pratiquement inexistante, il nous fallait d'abord essayer de déceler la nitrification ou rechercher si elle était entièrement supprimée par une longue période de conditions défavorables.

Une étude des autres facteurs pouvant gêner le fonctionnement de la station pourrait être entreprise ultérieurement, en complément des données de l'examen chimique, dans le cas où nos données s'avéreraient insuffisantes.

Nous nous proposons de procéder en deux étapes :

1° Déceler la présence des microbes nitrificateurs par des expériences de culture en milieu électif et noter l'allure du processus et, en cas de résultat positif :

(2) Lorsque l'on met 100 kg de pommes de terre, on retire 81 kg de légume épluché, 10 kg passent dans l'effluent.

2° Observer si l'allure de la nitrification se trouve accélérée par une aération intensive de l'échantillon.

Nous nous sommes occupés de ces faits *seulement*, le but de ce travail n'étant pas l'isolement d'espèces nouvelles ou l'identification d'espèces déjà rencontrées.

Méthodes et techniques. — Trois échantillons, prélevés le 20 novembre 1954, ont été mis à notre disposition, dont deux en double. Ce sont les suivants :

1° Cellule d'aération, 1 et 2 (« Aér. 1 » et « Aér. 2 ») : liquides.

2° Retour de la décantation secondaire à la cellule d'aération, I et II (« Ret. Déc. I » et « Ret. Déc. II ») : liquides.

3° Boues du bassin de Digestion (« B. B. D. ») : boues épaisses.

Nous nous proposons de décrire *seulement* les données obtenues avec les échantillons de la cellule d'aération (« Aér. 1 » et « Aér. 2 ») qui nous intéressent directement, les observations sur les autres échantillons seront décrites ailleurs.

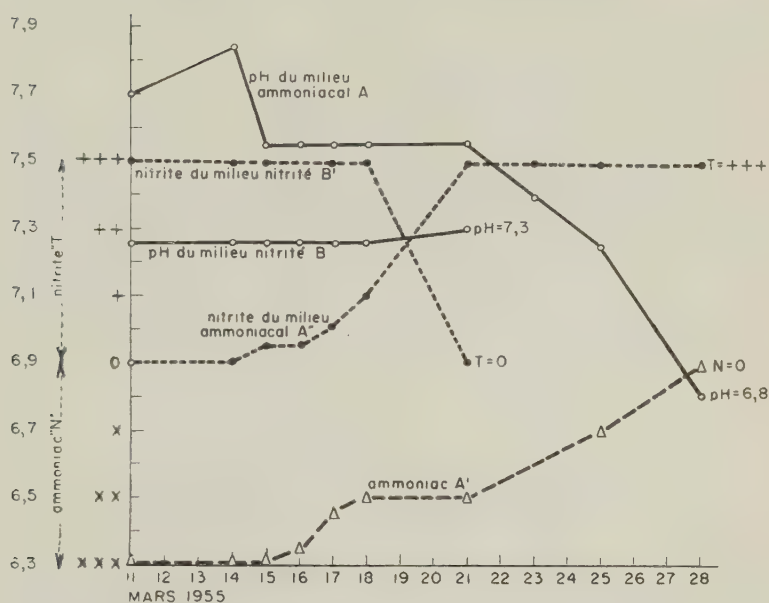
Nous avons employé, pour la culture des organismes nitrificateurs, la méthode courante de Winogradsky [28, 29, 30], que nous rappelons.

Des fioles d'Erlenmeyer d'une capacité de 150 ou 200 cm³ sont chargées de 100 cm³ de la solution saline standard (3) et additionnées de 0,2 cm³ d'une solution de sulfate d'ammonium à 5 p. 100 ou du même volume d'une solution de nitrite de potassium à 3 p. 100 selon la spécificité de l'organisme à rechercher. Les fioles à sel ammoniacal sont tamponnées (dans notre cas) de 0,2 g et 0,5 g de carbonate de calcium léger, amenant le pH à environ 7,5-7,6 et 7,6-6,7 respectivement. Ce chiffre est au-dessus du pH des échantillons qui est de 7,3-7,4, pour parer à la chute brusque qui se produit dès que l'oxydation du sel ammoniacal atteint son maximum d'intensité (voir graphiques) quand le niveau optimum minimum (d'environ 6,5 pour ces organismes) risque d'être dépassé et le processus entravé. Les fioles à nitrite reçoivent 0,3 g de kaolin lavé comme support. Leur pH se stabilise à 7,2-7,3 et reste invariable pendant toute la durée de l'expérience. Les fiolesensemencées de 1-2 cm³ de l'échantillon sont gardées à l'étuve à environ 20-23°. Des épreuves de Nessler et de Trommsdorf (4) sont faites tous les deux jours ainsi que celles du pH, qui est mesuré avec un comparateur de Hellige.

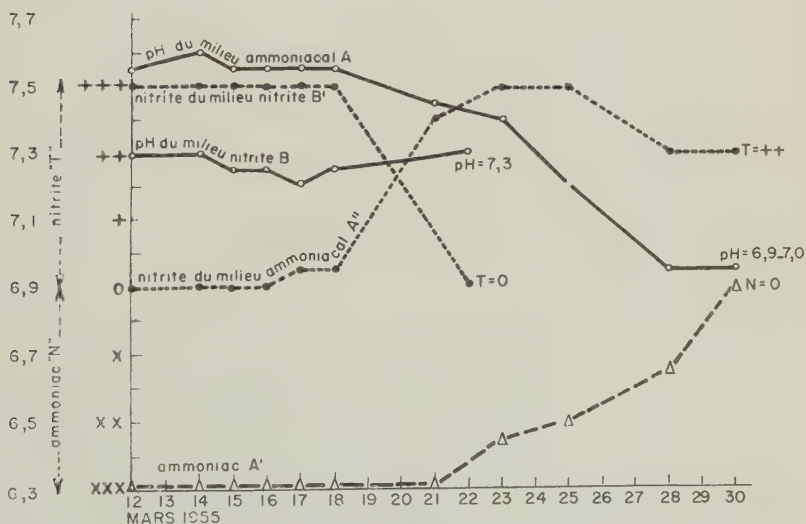
Expériences. — Les expériences ont été faites en deux groupes : 1° ensemencement direct des fioles avec l'échantillon *sans aéra-*

(3) Formule de la solution saline standard : phosphate de potassium (bibasique), 0,5 g ; phosphate de potassium (monobasique), 0,1 g ; sulfate de magnésium, 0,3 g ; chlorure de sodium, 0,2 g ; traces : sulfate ferreux, sulfate de manganèse, molybdate de sodium, sulfate de zinc, humates.

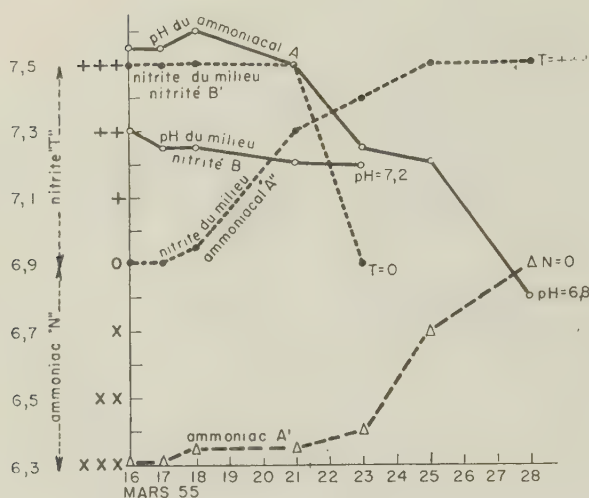
(4) Désigné par la suite : « N » et « T ».



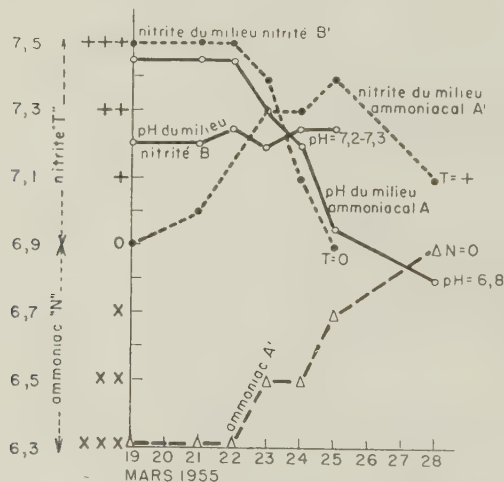
Graphique 1. — Marche du processus de la nitrification : premier repiquage après vingt-quatre heures d'aération de la culture-mère.



Graphique 2. — Marche du processus de la nitrification : deuxième repiquage de la culture-mère après quarante-huit heures d'aération.



Graphique 3. — Marche du processus de la nitrification : troisième repiquage de la culture-mère après un séjour de quarante-huit heures à l'étuve et quarante-huit heures d'aération.



Graphique 4. — Marche du processus de la nitrification : quatrième repiquage de la culture-mère après cent huit heures d'aération.

tion préalable ; 2° ensemencement des fioles avec l'échantillon après l'avoir soumis à une aération intensive pendant plusieurs heures.

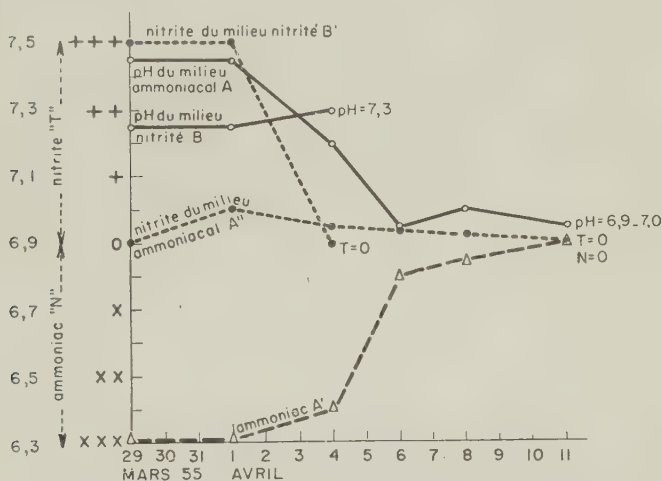
Groupe I. Ensemencement direct.

Le 26 novembre et le 9 décembre 1954. Un lot de quatre fioles Erlenmeyer de 200 cm³ contenant 100 cm³ de milieu à sel ammoniacal est ensemencé avec les échantillons « Aér. 1 » et « Aér. 2 ».

Le 16 décembre 1954 et le 13 janvier 1955. Un lot de quatre fioles est ensemencé avec les mêmes échantillons en milieu à nitrite de potassium.

On suit la consommation du métabolite énergétique.

Deux fioles-témoins, à blanc, sont installées avec chaque série. La



Graphique 5. — Marche du processus de la nitrification : cinquième repiquage après un séjour de dix jours à l'étuve de la culture-mère.

durée de la consommation du sel ammoniacal, ainsi que du sel nitrité est calculée sur la moyenne des données obtenues dans chaque expérience.

Groupe II. Ensemencement après aération de l'échantillon.

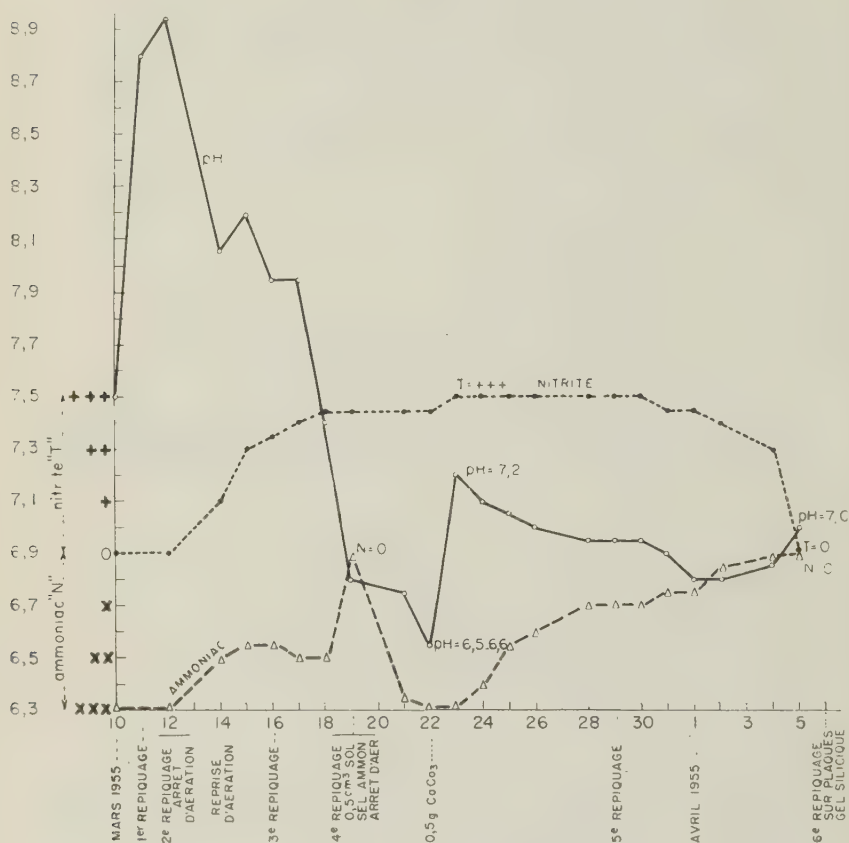
Le 10 mars 1955. Un flacon-laveur Durand de 500 cm³ est chargé de 200 cm³ des échantillons « Aér. 1 » et « Aér. 2 » à raison de 100 cm³ de chacun, bien mélangé, et les épreuves faites.

Réactions de la culture-mère avant aération :

pH = 7,5, N = XXX, T = traces.

On branche le flacon-laveur sur la trompe à eau du robinet et on passe l'air à une allure modérée, l'ayant au préalable passé par deux flacons Durand de 200 cm³ contenant une faible solution d'acide sulfurique et une faible solution de nitrate d'argent respectivement. Après vingt-quatre heures, quatre fioles Erlenmeyer (deux à sel ammo-

niacal et deux à nitrite) sont ensemencées de la manière habituelle et on suit leurs réactions. On pratique ainsi cinq séries d'ensemencements au cours de la période expérimentale : 1° après vingt-quatre heures : 2° après quarante-huit heures ; 3° après un intervalle de quarante-huit heures quand la culture-mère est mise à l'étuve et



Graphique 6. — Marche du processus de la nitrification dans l'échantillon « Cellule d'Aération » (Culture-mère) sous l'influence d'une aération intensive.

à nouveau aérée pendant quarante-huit heures ; 4° après cent huit heures d'aération ininterrompue, et enfin, 5° après un arrêt d'aération de dix jours de la culture-mère, qui est placée à l'étuve à 20-23°. Les résultats sont résumés sur des courbes (voir graphiques 1 à 5).

On verra (voir graphiques 1 à 5) que le pH des cultures accuse une chute brusque au fur et à mesure de l'oxydation du sel ammo-

niacal. Avec l'accélération du processus provoqué par l'aération, l'angle formé par la courbe ascendante A' (consommation de l'ammoniaque) et la courbe descendante A (pH) devient progressivement plus obtus. Dans les cultures du premier repiquage, la courbe A monte (voir graphiques 1 et 2) pendant les quelques jours suivant le repiquage. Cette montée est moins prononcée au troisième repiquage, devenant insignifiante au quatrième et cinquième. La consommation de l'ammoniaque A' augmente progressivement en relation directe avec la durée de l'aération de la culture-mère; elle se ralentit au cinquième repiquage après un séjour de dix jours à l'étuve de la culture-mère (voir graphique 5). La consommation de nitrite B' devient de plus en plus rapide: elle n'atteint pas son maximum au quatrième repiquage et ne dépasse pas l'index + au cinquième, montrant que les deux processus ont lieu simultanément (voir graphiques 4 et 5).

Observations de la culture-mère. — Le pH de la culture-mère accuse une élévation rapide: jusqu'à 8,8 environ (graphique 6), atteignant ce maximum au bout des premières vingt-quatre heures d'aération. Il commence à baisser progressivement à partir du quatrième jour de l'expérience, pour atteindre 6,8 au neuvième jour. Simultanément, la réaction « N » diminue en intensité et tombe à 0 au neuvième jour, tandis que la réaction « T » s'accroît progressivement et atteint le maximum au neuvième jour.

Le 19 mars 1955. — Réaction au neuvième jour de l'expérience :
pH = 6,8 ; N = 0 ; T = +++.

La culture est réalimentée en solution de sel ammoniacal à la même date et tamponnée de 0,5 g de carbonate de calcium léger, pour stabiliser le pH à environ 7,0-7,1. La nouvelle dose de métabolite est consommée en seize jours *ainsi que le nitrite formé*. La culture est repiquée sur plaques de gel silicique dans le but d'étudier la nature de la microflore. Macroscopiquement, les cultures ont l'aspect caractéristique des cultures de nitrificateurs. L'examen microscopique de ces cultures révèle la présence d'espèces à végétation phytogléique, ressemblant par leurs caractères morphologiques aux espèces observées antérieurement (*loc. cit.* [66, 67, 68, 69]). Elles seront décrites ailleurs (voir fig. 1 et 2).

Discussion et conclusion. — Notre travail a permis de déceler les causes du mauvais fonctionnement de la station, à savoir :

Surcharge très importante des eaux usées en matière à épurer. Cette surcharge provient essentiellement des cuisines.

Surcharge du bassin de digestion.

Aération insuffisante de la cellule d'aération, d'où la difficulté d'obtenir des boues activées de bonne composition. La nitrification ne s'effectue pas pratiquement.



FIG. 1. — Culture sur plaque de gel silicique, milieu à sel ammoniacal. Sixième repiquage de la culture-mère (6 mars 1955) après une période d'aération. Mélange : les formes phytogléiques prédominent.

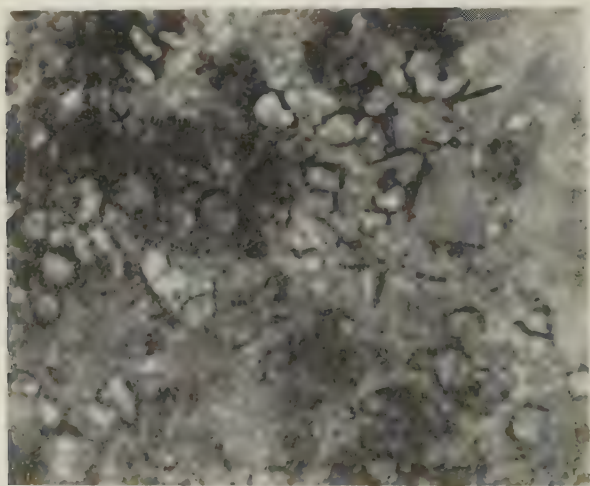


FIG. 2. — Culture sur plaque de gel silicique, milieu nitrité. Sixième repiquage de la culture-mère (6 mars 1955) après une période d'aération. Mélange : les formes phytogléiques prédominent.

Les données biologiques semblent confirmer cette observation, puisque : 1° le processus a lieu dans un milieu spécifique favorable, même sans aération préalable ; 2° une aération intense accélère le processus (5).

L'action des antiseptiques (eau de Javel...) est nulle ou tout à fait exceptionnelle lors de décharges éventuelles assez importantes ; l'action des antibiotiques serait nulle ou insignifiante, les quantités déversées dans les eaux usées étant relativement peu importantes.

L'action des détersifs (teepol...) est indirecte : d'une part ces produits risquent d'empêcher la sédimentation des boues par abaissement de la tension superficielle, d'autre part ils augmentent la quantité des produits à épurer en maintenant en émulsion les graisses qui sont normalement éliminées en grande partie sous forme de savons calcaires insolubles.

Les expériences biologiques confirment ces observations puisque la nitrification a lieu d'une façon normale dans l'échantillon brut aéré. Aussi il a été jugé superflu de faire des expériences de culture en milieu additionné de ces substances.

En conclusion, nous tenons à souligner que nos observations ne sont applicables qu'au cas étudié et ne doivent pas être acceptées comme règle générale. Les causes du mauvais fonctionnement d'une station d'épuration sont multiples : elles dépendent en particulier :

1° Du type du dispositif ;

2° Du volume des eaux usées et de leur qualité (industriel, domestique, hospitalier) ;

3° De la composition des eaux usées (charge en matières à épurer, taux des antiseptiques, des antibiotiques, des détersifs...).

Nous voudrions remercier bien vivement M. Feuillade, Directeur de la Station d'Épuration de Colombes, et M^{lle} Voisin, Chef du Laboratoire, de leur aide précieuse et de leurs conseils.

SUMMARY.

The causes of the faulty working of a sewage purification plant (Simplex system), belonging to the Sanatorium of Bergesserin (Saône-et-Loire, France), were investigated chemically and biologically. Chemical analysis showed chiefly : 1° overloading with organic matter ; 2° abnormally high B. O. D. (av. 160 as against 81 given by Imhoff for analogous cases) ; 3° high percentages of

(5) Des expériences parallèles, exactement semblables, faites avec les autres échantillons, confirment cette manière de voir ; elles seront décrites ailleurs.

ammonia N ; 4° no nitrous or nitric N. Furthermore, it was known that no activated sludge was formed in the aeration tank, and any fresh sludge added became necrosed. This suggested little or no nitrification in the tank. It was decided to make use of the process as a test for insufficient aeration. The sample from the tank, inoculated into the elective medium for nitrifying organisms gave positive results, but the process was very slow. In order to observe the effect of intensive aeration, air was bubbled through a representative portion of the sample in a Durand flask for several days. Nitrification was found to be progressively accelerated. From their combined data, the authors concluded, that insufficient aeration was the dominant factor causing the bad functioning of the plant. The effect of any detergents, disinfectants and antibiotics present was, in this case, found to be negligible.

BIBLIOGRAPHIE

- [1] J. J. WITS et F. J. AUSELUG. *Sewage and ind. Wastes*, 1951, **23**, 1219.
- [2] H. HEUKELEKIAN, C. B. MCMINAMIN et M. C. RAND. *Sewage and ind. Wastes*, 1952, **24**, 723.
- [3] F. MCARTHUR. *Eng. Contract Rec.*, 1952, **65**, 82.
- [4] DANIEL A. OKUN. *Water and Sewage Works*, 1953, **100**, 374.
- [5] J. N. HOLLAND. *Inst. of Sewage Purif., J. and Proc.*, 1951, 387.
- [6] A. PASVEER. *Sewage and ind. Wastes*, 1953, **25**, 1230 et 1397.
- [7] *Nederlansche Centrale Organisatie voor Toegepast Natuur Wetenschappelijk Onderzoek* T. N. O., 16 août 1954, *Dutch* 75,389.
- [8] K. IMHOFF. *Gas u. Wasserfach*, 1955, **90**, 43.
- [9] H. HEUKELEKIAN. *Sewage and ind. Wastes*, 1951, **23**, 273.
- [10] C. LEIBEE et R. L. SMITH. *Publ. Works*, 1951, **82**, 55.
- [11] S. C. PILLAI, M. I. GURBAXANI et K. P. MENON. *Indian med. Gaz.*, 1952, **87**, 117.
- [12] L. R. MAKI. *Ant. Leeuwenhoeck*, 1954, **20**, 185.
- [13] C. E. KEEFER et JOSEPH MEISEL. *Sewage and ind. Wastes*, 1951, **23**, 982.
- [14] E. T. KILLAM. *Water and Sewage Works*, 1950, **97**, 129.
- [15] G. LESCOEUR. *La chimie et la physicochimie au service de l'hydrologie moderne*, Vigot frères, édit., Paris, 1953 ; *Chimie et Ind.*, 1953, **69**, 276.
- [16] H. WILSON. *Inst. of Sewage Purif., J. and Proc.*, 1950, 433.
- [17] T. STONES. *Contr. Rec.*, 1955, **64**, 29 ; *Water Poll. Abstr., Dep. Sc. Ind. Res.*, **26**, 232.
- [18] WALTER A. SPERRY. *Sewage and ind. Wastes*, 1951, **23**, 1409.
- [19] C. E. KEEFER. *Water and Sewage Works*, 1952, **99**, 84.
- [20] J. R. GAILLARD. *Inst. of Sewage Purif., J. and Proc.*, 1950, 276.
- [21] REINHARD DEMOLL. *Gas u. Wasserfach*, 1954, **95**, 97.
- [22] C. LUMB. *Water and San. Eng.*, 1953, **3**, 7 et 53.
- [23] RAYMOND MANGANELLI. *A. S. T. M.*, 1953, *Bull.* n° 192, 57.

- [24] P. N. DEGENS JR., H. VAN DER ZEE et J. D. KOMMER. *Sewage and ind. Wastes*, 1954, **26**, 1081.
- [25] L. W. WINKLER. In *Analytische Chemie*, par F. P. Treadwell et W. D. Treadwell, p. 667, 11^e édit., Franz Denticke, édit., Leipzig, 1923 ; *Journal officiel*, 20 juin 1953, n° 143, 5498.
- [26] K. IMHOFF. *Manuel de l'Assainissement urbain* (trad. Pierre Koch), 3^e édit., Dunod, édit., Paris, 1955.
- [27] HÉLÈNE WINOGRADSKY. *Ann. Inst. Pasteur*, 1937, **58**, 326 (Bibliographie).
- [28] S. WINOGRADSKY et H. WINOGRADSKY. *Ann. Inst. Pasteur*, 1933, **50**, 350.
- [29] S. WINOGRADSKY. *Microbiologie du Sol*, Masson et C^{ie}, édit., Paris, 1949.
- [30] J. POCHON. *Manuel technique d'Analyse microbiologique du Sol*, Masson et C^{ie}, édit., Paris, 1954.
- [31] HÉLÈNE WINOGRADSKY. *Ann. Inst. Pasteur*, 1937, **58**, 326.
- [32] HÉLÈNE WINOGRADSKY. *Trans. III^e Cong. Int. Sci. Sol*, 1935, **1**.
- [33] HÉLÈNE WINOGRADSKY et G. BOUTILLIER. *Ann. Inst. Pasteur*, 1949, **76**, 239.
- [34] HÉLÈNE WINOGRADSKY. *Ann. Inst. Pasteur*, 1949, **76**, 35.

CONTRIBUTION A L'ÉTUDE DES ANTIGÈNES LEUCOCYTAIRES ET THROMBOCYTAIRES DE L'HOMME ET DES ANIMAUX

par M. SAINT-PAUL, P. MILLOT et A. EYQUEM (*)

(Institut Pasteur,
Laboratoire d'Hématologie et des Groupes sanguins.
Centre d'Etude des Groupes sanguins des Animaux
[Service de M. R. DUJARRIC DE LA RIVIÈRE])

Depuis quelques années, l'étude en clinique humaine d'anticorps actifs sur les leucocytes et les thrombocytes a mis l'accent sur les propriétés antigéniques de ces éléments figurés du sang. Des publications nouvelles ont rendu ainsi d'actualité les travaux fondamentaux des immunologistes du début de ce siècle, travaux qui ont été passés en revue par Dujarric de la Rivière et Eyquem. L'étude d'autres sérums homologues, actifs sur divers éléments figurés, a montré que ces éléments possèdent non seulement une spécificité d'espèce, mais encore une spécificité cellulaire et une spécificité de lignée.

En utilisant les sérums de divers animaux immunisés vis-à-vis de globules rouges, de globules blancs, ou de plaquettes sanguines, nous nous sommes efforcés de mettre en évidence, chez certains mammifères, des communautés antigéniques entre ces éléments. On sait, en effet, que, si l'on trouve chez les animaux des hétéro-agglutinines naturelles actives vis-à-vis d'une espèce donnée, il existe aussi des agglutinines hétérophiles, actives sur certains groupes antigéniques communs à plusieurs espèces. L'immunisation des animaux peut élever le titre sérique de ces agglutinines ou, si elles sont absentes, déterminer leur élaboration, ce qui permet la recherche des antigènes correspondants.

De plus, la configuration des globules rouges varie d'une espèce à l'autre ; chez les bovins par exemple, on peut, par différentes méthodes (Coombs, Gleeson-White, 1954, et Dujarric de la Rivière, Saint-Paul et Eyquem, 1954), classer à cet égard les animaux en plusieurs catégories. On peut se demander si, dans ces mêmes espèces, les antigènes des leucocytes ou des plaquettes

(*) *Société Française de Microbiologie*, séance du 1^{er} décembre 1955.

sanguines ne seraient pas disposés d'une autre façon que ceux des hématies. Dans ce cas, on aurait des chances de déceler sur les leucocytes et les thrombocytes des antigènes qui sont inaccessibles sur les globules rouges.

Nous avons donc recherché les communautés antigéniques entre différentes espèces animales et les groupements antigéniques ayant pu éventuellement passer inaperçus lors de l'étude des globules rouges par les techniques habituelles. Il n'est, d'ailleurs, pas exclu que de tels groupements soient responsables de certaines immunisations observées au cours de processus pathologiques : leur étude, dans ce cas, pourrait faciliter le diagnostic biologique des syndromes correspondants.

I. — ANTIGÈNES LEUCOCYTAIRES.

Depuis que Metchnikoff a obtenu, en 1899, des sérums leucotoxiques par immunisation de lapin vis-à-vis de suspensions ganglionnaires ou spléniques de rat et conclu à la *spécificité d'espèce* des leuco-anticorps, de nombreux auteurs ont apporté leur contribution. Parmi les premiers :

Besredka (1900) étudia *in vivo* l'action de sérums obtenus par immunisation à l'aide de ganglions lymphatiques de cheval, bœuf, mouton, chien, chèvre.

Delezenne prépara des sérums leucolytiques de lapin anti-ganglions lymphatiques de rat, de chat, et Bierry des sérums d'oie, de canard, de lapin, anti-leucocytes de chien.

Les nombreux travaux publiés depuis sur ce sujet comportent, en général, des recherches simultanées sur la réaction *in vitro* et sur l'effet *in vivo* des sérums anti-leucocytaires. La plupart des auteurs ont utilisé comme techniques de base *in vitro* l'agglutination et la lyse, plus rarement la fixation du complément, l'étude au microscope en contraste de phase, l'opsonisation et la phagocytose et leur inhibition, la précipitation en milieu liquide ou en milieu gélifié, l'hémagglutination passive, etc.

In vivo, l'injection du sérum à l'animal qui a fourni l'antigène est évidemment la méthode de choix ; mais l'injection à un animal d'une autre espèce peut permettre, dans certains cas, de révéler des communautés antigéniques.

Mais, dès le début de ces études, Besredka émettait quelques réserves sur la spécificité d'espèce, en montrant qu'un sérum leucotoxique de cheval anti-bœuf est actif sur le lapin et qu'un sérum analogue de chèvre anti-homme agit sur les globules blancs de cobaye. De même, Woltmann montrait, en 1905, qu'un sérum médullo-toxique d'oie anti-mouton était actif également sur le lapin. En somme, ces réserves portaient déjà en germe le problème actuel des communautés antigéniques.

La *spécificité d'organe* ou de tissu a été établie notamment par Delezenne qui observa l'effet leucopénique, chez le chien, d'un sérum de lapin anti-ganglion lymphatique ou rate de chien. De son côté Ritchie (1908), ayant préparé un sérum de canard anti-thymus de cobaye, constata que son activité s'étendait du thymus aux ganglions lymphatiques, à la rate et à la moelle osseuse, mais non au foie, au poumon, aux surrénales, à la thyroïde. Les lésions histologiques correspondantes furent bien examinées par Flexner (1902). Christian et Leen (1905) observèrent encore que des animaux immunisés à l'aide de suspensions de foie, rein, ou cœur, élaborent aussi des leucotoxines.

On doit distinguer de la *spécificité tissulaire*, la *spécificité cellulaire*.

Pappenheimer (1912) et de nombreux auteurs après lui ont observé que les leucolysines sont différentes des hémolysines. Il est de même possible de distinguer des agglutinines anti-érythrocytaires, des agglutinines anti-leucocytaires et des agglutinines anti-thrombocytaires (Menne, 1922 ; Rosenthal et Falkenheim, 1922 ; Sakai, 1934 ; Saint-Paul et Moloney, 1952). Mais si les leucocytes et les érythrocytes possèdent des antigènes différents, cela ne signifie pas qu'il y ait absence complète de communautés antigéniques entre eux. Dès 1928, Wichels et Lampe avaient constaté que les iso-hémagglutinines anti-A et anti-B réagissaient spécifiquement sur des globules blancs de leucémiques. Thomsen retrouva ces antigènes par absorption des iso-hémagglutinines (1930). Ce fait a été confirmé plus récemment par Tullis (1953), puis Moeschlin et Schmidt (1954), qui observèrent une agglutination leucocytaire dans 34 p. 100 des cas où l'on avait incompatibilité pour le système A, B, O. Dausset, de même que van Loghem, a constaté la présence sur les leucocytes de ces antigènes érythrocytaires en employant des immunosérums puissants.

Chez les animaux, Witebsky et Komyia (1930) ont constaté que les sérums de lapin anti-leucocytes de cobaye possèdent des anticorps de Forssman et qu'il existe, dans les sérums anti-globules rouges de cobaye, des anticorps anti-globules blancs et rate de cobaye. Nungester, Gordon et Collins (1950) ont étudié les antigènes situés à la surface des globules rouges et blancs de cobaye par la technique d'agglutination. A l'aide d'immunosérums, du virus de la grippe, du polyoside pneumococcique et à l'aide de l'agglutinine végétale de *Phaseolus communis*, ils ont mis en évidence des communautés antigéniques entre ces deux sortes de cellules. Mais ces communautés ne correspondent pas à des antigènes identiques, car il existe de très profondes différences, que montrent notamment les expériences d'absorption d'anticorps.

Il existe aussi des communautés antigéniques entre les leucocytes et des cellules d'autres tissus que le tissu hématopoïétique.

C'est ainsi qu'Amos a pu, chez la souris, découvrir des antigènes spécifiques d'une souche et communs aux leucocytes et à la peau. Adler les a retrouvés dans le rein, le poumon, le foie et la rate.

Des différences antigéniques entre les différentes lignées leucocytaires ont été établies.

Il est possible de préparer des sérums *anti-polynucléaires* (Gladin, 1901 ; Spit, 1914 ; Hueper et Russel, 1932, etc.) ayant une action spécifique sur ces éléments *in vitro*, et chez l'animal (Yamamoto). Chez l'homme, ces sérums ont été utilisés dans le traitement de la leucémie myéloïde (Lindström, 1926). Notons que certains auteurs ont réussi à préparer des suspensions homogènes et assez pures de polynucléaires éosinophiles. Ceux-ci possèdent des antigènes résistant à l'alcool et au formol, mais non à l'acétone (Marti, Esselier et Morandi, 1954).

Par ses antigènes, il est possible de différencier le *lymphocyte* du polynucléaire, comme on le distingue des hématies et des plaquettes sanguines (Saint-Paul et Moloney, 1952). *In vivo*, il est possible de provoquer une lymphopénie chez le rat ayant reçu un sérum de lapin anti-lymphocytaire de rat (Chew, Stephens et Lawrence, 1936 ; Cruickshank, 1941). Au contraire, un puissant sérum de lapin anti-lymphocytes humains n'agit pas *in vivo* sur les lymphocytes du cobaye et du chien (Saint-Paul et Moloney, 1951). Il n'existerait donc pas d'antigène commun aux lymphocytes de ces trois espèces. Cependant, les mêmes auteurs ont constaté, sur une série de chiens, que le sérum de 10 p. 100 des animaux agglutinait les lymphocytes humains.

Le *pus* a été l'objet de recherches sérologiques : Dmochowski (1938) a observé que le pus de cobaye, de lapin, ou de rat, n'avait pas de parenté avec celui de l'homme ou du cheval ; le pus de cobaye ne possédait pas l'antigène Forssman. En revanche le pus humain, le caséum humain et celui du bœuf présentaient une parenté antigénique.

La *moelle osseuse*, bien que très antigénique, est, du fait de sa complexité, d'une étude assez difficile : Björklund (1952) a préparé un sérum de cheval anti-moelle osseuse de lapin et, par la méthode de précipitation en milieu gélifié d'Ouchterlony, a observé que la moelle de lapin contenait quatre composants antigéniques dont aucun n'était spécifiquement médullaire, puisqu'on constatait la présence de ces composants dans le foie, la rate, le poumon, les surrénales.

Les techniques histochimiques et de centrifugation différentielle permettent maintenant d'obtenir des préparations antigéniques de *fractions leucocytaires*. Ainsi Cajano, Ross et Finch (1954) ont immunisé des cobayes à l'aide de cytoplasmes et de noyaux de polynucléaires ou de lymphocytes spléniques et ont obtenu ainsi des antisérums dont ils ont vérifié l'activité *in vivo*. Le

sérum anti-cytoplasme de polynucléaires de cobaye, qui provoque une neutropénie nette et persistante, est le plus actif.

Le cytoplasme des polynucléaires possède un pouvoir antigénique propre et le sérum de cobaye anti-cytoplasme de polynucléaire provoque des lésions des polynucléaires et les agglutine. Cet antigène a aussi un caractère hétérophile, indépendant de l'antigène de Forssman, puisque du sérum de cobaye anti-cytoplasme de polynucléaire humain agit aussi sur les polynucléaires de lapin (Miescher).

Le noyau des leucocytes possède un antigène spécifique, car un sérum anti-nucléoprotéines provoque des lésions des noyaux des polynucléaires et plus faiblement des noyaux des lymphocytes. Il existe un antigène nucléaire commun à l'homme et au lapin. Ce sont surtout les nucléoprotéines qui sont le support de la spécificité antigénique du noyau, mais celle-ci est commune aux noyaux de différentes lignées cellulaires (foie, reins, leucocytes) [Miescher].

En étudiant l'immunophagocytose à l'aide d'antisérums de cobayes immunisés vis-à-vis de différents extraits tissulaires, il a été possible à Miescher de comparer les communautés antigéniques existant entre chaque lignée de leucocytes et les organes. Les *lymphocytes* sont sensibles à l'action de sérums anti-leucocytes, thymus, ou rate, mais ne sont pas modifiés par les sérums anti-globules rouges, plaquettes, poumon, foie, conjonctif, muscle ou rein.

Parmi ces derniers sérums, les sérums anti-poumon et conjonctif provoquent des lésions des *polynucléaires*.

Les plaquettes sont, au contraire, agglutinées par tous les sérums sauf le sérum anti-poumon.

Des aspects morphologiques analogues à ceux présentés par les cellules « L. E. » peuvent être obtenus après action du sérum de lapin anti-leucocytes de leucémie myéloïde (Finch, Ross et Ebaugh), ou en faisant agir le facteur sérique « L. E. » sur les leucocytes de certains animaux (Berman, Axelrod, Goodman et Mc Claghry, 1950).

Les leucocytes de poulet et de cheval sont particulièrement sensibles à ce facteur ; ceux de cobaye ou de chien le sont moins, tandis que ceux de rat, de chat et de lapin le sont encore moins.

Les techniques fines de l'immunochimie permettent pour une seule lignée de leucocytes, d'isoler plusieurs *fractions antigéniques*. Grabar, Seligmann et Bernard (1954) ont opéré sur des suspensions leucocytaires lavées et homogénéisées avec un soin particulier. Ils ont distingué, dans les leucocytes normaux, trois ou quatre antigènes spécifiques. Les leucoblastes et les lymphocytes de la leucémie lymphoïde chronique ne possèdent pas l'un

des antigènes, qui est présent dans les leucocytes des sujets normaux.

Des anticorps analogues peuvent être mis en évidence *in vivo* par injection intradermique de lysats leucocytaires aux malades, ou par le phénomène d'anaphylaxie passive de type Prausnitz-Küstner (M. Seligmann, P. Garbar, J. Bernard, 1954).

Il existe de plus des iso-leuco-agglutinines qui ont été décelées chez des malades leucopéniques et leucémiques (Dausset, Miescher), mais dont la plupart ont été polytransfusés.

On connaît, cependant, une vingtaine d'exemples signalés chez des malades non transfusés et n'ayant pas reçu de médicaments allergènes dans les semaines qui précèdent, ce qui permet de différencier ces agglutinines des anticorps allergiques.

Les leuco-agglutinines doivent correspondre à de nombreux antigènes différents, car elles sont actives sur les leucocytes d'une proportion très variable de donneurs (Dausset-Miescher).

L'activité hétérophile des leuco-agglutinines humaines est responsable de la leucopénie qui apparaît chez le lapin à la suite d'injection de sérum de malade ou d'un extrait splénique (Miescher). Ces leuco-agglutinines sont, de plus, parfois actives *in vitro* sur les leucocytes de cobaye (Moeschlin et Moreno, 1954).

II. — LES THROMBOCYTES.

C'est Hayem (1878-1900) qui signala pour la première fois la grande agglutinabilité des plaquettes sanguines, qui peut apparaître *in vivo* et *in vitro* indépendamment de tout anticorps. En revanche, l'agglutination des plaquettes peut également survenir sous l'influence d'anticorps anti-plaquettaires que Marino et Lesourd, Pagniez (1906) furent les premiers à étudier. L'agglutination est soumise à l'influence de nombreux facteurs favorisants ou défavorisants et son mécanisme est intimement lié à la présence des protéines. Celles-ci, pour de nombreux auteurs, seraient absolument indispensables à l'agglutination des plaquettes, créant notamment autour de celles-ci une « atmosphère protéinique ».

Dès 1922, Menne avait vu, en comparant l'action de sérums anti-moelle osseuse, anti-rate et anti-plaquettes, que celles-ci possédaient des antigènes qui leur sont propres et qui, chez l'homme et le poulet, les apparentent plus aux globules blancs qu'aux globules rouges. De leur côté, Rosenthal et Falkenheim (1922) ont noté, à l'aide d'immunsérums, une parenté antigénique entre les plaquettes et les leucocytes.

Dans les expériences *in vivo* comportant l'injection à l'animal d'un immunsérum anti-plaquettaire hétérologue, on constate habituellement, en plus de l'action thrombocytopénique du sérum,

un effet purpurigène (Ledingham, Bedson, Roskam), qui peut en être dissocié (Bedson 1922, Tocantins 1937).

Chez l'homme, le rôle joué par les thrombocytes dans certains syndromes d'origine immunitaire a été mis en relief dans ces dernières années. On peut, cependant, en trouver déjà une indication dans les travaux de Widal, Abrami et Brulé (1908) faisant état, chez quelques malades, de la présence simultanée d'une anémie hémolytique et d'un purpura.

La thrombopénie provoquée chez le lapin par injection du sérum d'un malade thrombopénique suivant la technique de Miescher est basée sur l'existence de communautés antigéniques entre les plaquettes d'homme et de lapin. L'anticorps contenu dans la rate de ces malades est aussi thrombopénique pour les cobayes (Miescher).

Copley et Houlihan (1947) ont bien montré que l'agglutinabilité des plaquettes différait suivant l'espèce animale et même suivant les techniques de prélèvement et d'agglutination utilisées. De plus, ils ont suggéré l'existence possible de parentés antigéniques entre les plaquettes d'homme, de chien et de porc. De même, l'observation de Stefanini et Adelson (1951) d'une thrombo-agglutinine hétérophile de type Forssman, active sur les hématies de mouton et les plaquettes de chien, lapin, rat, mais inactive sur les plaquettes humaines, montre qu'il existe des parentés entre les antigènes plaquettaires de certaines espèces.

La présence, maintes fois constatée depuis quelques années, de thrombo-agglutinines chez les polytransfusés, la possibilité de production de tels anticorps par immunisation foeto-maternelle (Harrington, 1952 ; Stefanini, 1952 ; Dausset, 1952) sont en faveur de différences antigéniques dans une même espèce. Chez l'homme, plusieurs systèmes d'antigènes plaquettaires, décelables par agglutination, ont été décrits (Harrington, 1953 ; Stefanini, 1953). Les méthodes différentes employées par les auteurs, leurs critères d'agglutination particulièrement délicats à apprécier, font qu'il est encore difficile de se prononcer sur les iso-antigènes thrombocytaires.

Des *précipitines* actives en milieu gélosé vis-à-vis de lysats plaquettaires ont été décelées dans le sérum thrombopénique (Ruggieri, 1955). Trois antigènes peuvent être isolés, dont deux sont propres aux plaquettes et un réagit avec le sérum anti-globulinique.

En plus d'antigènes spécifiques des plaquettes, la présence sur celles-ci d'antigènes de groupes sanguins A et B est maintenant établie (Moureau et André, Gurevitch et Nelken, 1954 ; Maupin et Berroche, Ruggieri et Bolognesi, 1955).

Les anticorps anti-thrombocytaire peuvent être décelés *in vitro* de diverses manières.

L'*agglutination* est restée jusqu'à ce jour la technique la plus simple. De nombreuses modifications y ont été apportées : l'agitation (Dausset et Malinvaud, 1954) augmente sa rapidité, le traitement des plaquettes par un enzyme protéolytique (Harrington, 1954) augmente sa sensibilité.

La *réaction de Coombs* directe ou indirecte, révèle des anticorps non agglutinants. Il s'agit souvent d'iso-, parfois d'auto-anticorps.

Les *techniques de lyse* (Ninni, 1952 ; Tullis, 1953) sont plus difficiles et plus délicates à interpréter. Stefanini leur a adjoint une réaction montrant la libération d'un facteur thromboplastique par les plaquettes lysées.

L'*hémagglutination passive* (Boyden, Borduas et Grabar) a été appliquée à la mise en évidence des anticorps anti-plaquettaires (Kissmeyer-Nielsen, 1953, puis Sauer et van Loghem, 1954 ; Dausset, 1955). Satisfaisante lorsqu'on utilise des sérums expérimentaux, elle donne des résultats moins spécifiques avec les sérums humains pathologiques.

La *fixation du complément* a également été essayée (Ackroyd, Maupin, 1955) pour l'étude des hétéro-anticorps. La *réaction de Kline* a pu être adaptée aux recherches d'anticorps anti-thrombocytaires (Moulinier et Mesnier, 1954), ainsi que la réaction de *fixation de l'anti-globuline* (Steffen, 1954 ; Moulinier, 1955) ; les résultats ont été variables.

Enfin, la *précipitation en milieu gélifié* a été employée dernièrement avec succès par Ruggieri (1955).

RECHERCHES EXPÉRIMENTALES.

I. AGGLOUTINATION. — Nous avons étudié comparativement le pouvoir agglutinant de divers immunsérums sur les trois catégories d'éléments figurés du sang provenant d'homme, de mouton, de bœuf et de cheval. Ceux-ci, en suspension dans l'eau physiologique, furent mis au contact de dilutions croissantes de sérum et les lectures furent effectuées au microscope, par étalement, après une heure de sédimentation. Les résultats de ces examens sont consignés dans le tableau I.

On observe certaines divergences, dans la réaction sur les mêmes éléments, de deux immunsérums de même spécificité. On voit cependant que, si le titre d'un sérum n'est pas toujours maximum vis-à-vis de l'antigène injecté, du moins il est plus fort vis-à-vis des éléments figurés injectés que vis-à-vis des éléments similaires d'autres espèces. Cette règle pourrait néanmoins être en défaut comme en témoigne le cas du sérum de lapin anti-globules rouges de bœuf. On voit encore que l'action agglutinante des sérums s'étend toujours aux trois catégories d'éléments

TABEAU I. — Titres comparés de quelques immunsérums animaux vis-à-vis des éléments figurés du sang prélevé chez l'homme et dans trois espèces animales.

SÉRUMS EXAMINÉS :	ÉLÉMENTS FIGURÉS				ESPÈCES ÉTUDIÉES :											
					HOMME			MOUTON			BOEUF			CHEVAL		
	GR.	GB.	PL.		GR.	GB.	PL.	GR.	GB.	PL.	GR.	GB.	PL.	GR.	GB.	PL.
LAPIN NORMAL	32	1	0	128	2	1	0	0	1	2	8	0				
LAPIN ANTI- GLOBULES ROUGES d'HOMME	16000	128	8	32	2	1	0	1	0	8	2	0				
LAPIN ANTI- GLOBULES BLANCS d'HOMME	1000	2000	512	256	8	1	2	0	0	32	512	1				
" " " "	2000	16	4	2	4	2	0	4	0	16	128	0				
LAPIN ANTI- PLAQUETTES d'HOMME	256	128	16	64	0	0	2	0	0	32	4	2				
" " " "	4000	512	64	32	2	8	0	0	8	256	4	0				
LAPIN ANTI- PLAQUETTES DE MOUTON	512	128	128	4000	4	1000	2	4	128	512	0	16				
" " " "	16	4	1	1000	4	32	4	16	8	128	256	0				
LAPIN ANTI- GLOBULES ROUGES DE BOEUF	128	128	16	2000	4	64	16	8	32	64	32	8				
LAPIN ANTI- PHASÉOLINE	16	1	2	8	8	0	2	4	2	16	64	4				
BOEUF ANTI- GLOBULES ROUGES d'HOMME	32000	512	32	32	0	0	0	0	0	512	64	16				
CHEVAL ANTI- GLOBULES ROUGES d'HOMME	64000	128	64	256	4	1	2	0	0	32	1	0				

figurés : globules rouges, globules blancs, plaquettes. Ce dernier fait peut relever de plusieurs causes : 1° l'impureté des extraits antigéniques injectés : c'est le cas actuellement des préparations de globules blancs ; 2° l'existence de communautés antigéniques qui peuvent être de deux types : A) communautés entre des éléments figurés de même lignée obtenus dans plusieurs espèces ; B) communautés entre cellules de diverses lignées dans une même espèce. L'action du sérum de lapin anti-globules blancs d'homme sur les globules blancs de cheval, celle du sérum de lapin anti-plaquettes de mouton sur les plaquettes d'homme, de bœuf, de cheval, sont des exemples du premier type de communauté, l'action du sérum de bœuf anti-globules rouges d'homme sur les globules blancs et les plaquettes humaines est un exemple du second type de communauté.

Le tableau I montre encore que les anticorps élaborés ont une affinité beaucoup plus faible pour les antigènes des globules blancs ou des plaquettes que pour les antigènes érythrocytaires, vis-à-vis desquels on obtient souvent les titres les plus élevés. Le pouvoir antigénique des globules rouges est également bien meilleur que celui des autres éléments. Mais le cas du sérum de lapin anti-phaséoline est intéressant, car il nous montre que

lorsqu'un animal n'a reçu aucune injection de globules rouges, le titre anti-hématies de son sérum n'est pas toujours supérieur au titre anti-leucocytes ou anti-plaquettes.

Nous avons, de plus, titré vis-à-vis des globules rouges et des plaquettes sanguines de cheval, bœuf, mouton, chèvre, porc, chien, lapin, le sérum normal de deux lapins, de deux chèvres, et l'immunsérum d'une chèvre anti-leucocytes et plaquettes de mouton.

Le sérum normal de lapin n'agglutinait pas les globules rouges et les plaquettes de lapin, les globules rouges de bœuf, de mouton, mais agglutinait au 1/2 les divers autres éléments, excepté les plaquettes de chien qui étaient agglutinées au 1/8.

Le sérum normal de chèvre agglutinait les globules rouges de cheval, de lapin, parfois de chien, à des dilutions comprises entre 1/8 et 1/32. Il ne réagissait à peu près pas sur les plaquettes des différentes espèces, excepté sur celles de chien qu'il agglutinait jusqu'au taux de 1/64.

Le sérum de chèvre anti-leucocytes et plaquettes de mouton n'agglutinait pas les plaquettes de bœuf, de chèvre, mais agglutinait les plaquettes de mouton, porc, lapin au 1/4, celles de cheval au 1/8, celles de chien au 1/64, de même que le sérum normal de chèvre.

Les plaquettes de chien nous sont donc apparues extrêmement agglutinables, ce que certains auteurs avaient déjà noté. De plus, le dernier sérum étudié semble en faveur de l'existence d'une communauté plaquettaire entre cheval, mouton, porc et lapin. On ne peut rien dire du chien, dont les plaquettes sont agglutinées à un titre élevé par le sérum des témoins.

II. ABSORPTION D'AGGLUTININES ANTI-THROMBOCYTAIRES. — C'est surtout au moyen d'absorption de sérums sur des culots plaquettaires distincts que des communautés antigéniques entre les plaquettes de diverses espèces ont pu être précisées. Quatre lapins ont été immunisés ainsi qu'il suit :

384 et 385 anti-thrombocytes de bœuf ;

381 anti-thrombocytes de porc ;

383 anti-leucocytes de bœuf.

Six injections intraveineuses de suspension de thrombocytes conservés au congélateur et dilués au 1/2 dans l'eau physiologique ont été faites, échelonnées sur deux mois, et neuf injections de leucocytes conservés et dilués de même ont été réparties sur trois mois. Les immunsérums obtenus ont été fractionnés après absorption sur des culots plaquettaires provenant de six espèces de mammifères. Ces absorptions ont été effectuées sur un volume total de 2 cm³ : 1 cm³ de sérum était mis au contact de 0,5 cm³

de culot plaquettaire dilué dans 0,5 cm³ d'eau physiologique. Le contact était d'environ trente minutes à 18° C.

Des titrages comparatifs ont été effectués vis-à-vis de suspensions plaquettaires des différentes espèces, en faisant intervenir les sérums témoins non absorbés et leurs différentes fractions absorbées. Les lectures ont été faites au microscope, après éta-

TABLEAU II. — Titres comparés, vis-à-vis de différentes suspensions plaquettaires, de deux sérums anti-thrombocytaires et de leurs fractions absorbées préparées au moyen de culots plaquettaires d'espèces différentes.

A ABSORPTION:		SÉRUM DE LAPIN ANTI-PLAQUETTES DE BŒUF						
384		TITRES VIS À VIS DES PLAQUETTES DE :						
		BŒUF	MOUTON	CHEVRE	PORC	CHEVAL	CHIEN	LAPIN
SÉRUM NON ABSORBÉ		64	8	64	8	8	64	0
SÉRUM ABSORBÉ AVEC CULOTS PLAQUETTAIRES DE :	BŒUF	16	16	0	4	16	16	0
	MOUTON	64	4	0	4	2	4	0
	CHEVRE	64	8	0	0	2	8	0
	PORC	64	8	0	0	16	32	0
	CHEVAL	64	4	32	4	0	32	0
	CHIEN	64	2	4	4	8	16	0

381		SÉRUM DE LAPIN ANTI-PLAQUETTES DE PORC						
		SÉRUM DE LAPIN ANTI-PLAQUETTES DE PORC						
		BŒUF	MOUTON	CHEVRE	PORC	CHEVAL	CHIEN	LAPIN
SÉRUM NON ABSORBÉ		8	16	8	64	8	32	0
SÉRUM ABSORBÉ AVEC CULOTS PLAQUETTAIRES DE :	BŒUF	0	4	2	32	16	8	0
	MOUTON	0	4	0	32	0	8	0
	CHEVRE	0	0	0	16	0	16	0
	PORC	0	0	0	0	0	0	0
	CHEVAL	0	0	0	8	0	8	0
	CHIEN	0	8	16	32	8	2	0

lement sur lame, au bout d'une heure de sédimentation. Pour trois des quatre sérums (le dernier ayant un titre trop faible), les résultats sont réunis dans les tableaux II et IV A. Sur ces tableaux sont inscrits, suivant des lignes horizontales, les titres vis-à-vis des suspensions plaquettaires de différentes espèces : 1° du sérum étudié, avant absorption ; 2° des échantillons du sérum après leur mise en contact avec des culots plaquettaires différents.

On remarque que dans 7 cas sur 17, l'absorption n'est pas complète à l'égard de la suspension témoin correspondant au culot utilisé pour l'absorption. Si l'on considère l'état de division

du culot plaquettaire résultant des faibles dimensions des éléments qui le constituent, on doit penser que les plaquettes sanguines sont, toutes proportions gardées, beaucoup moins riches en antigènes que les globules rouges.

Mais dans ces études sérologiques où la recherche d'anticorps n'est pas seulement qualitative, mais encore quantitative, nous pensons qu'il y a parfois avantage à faire une absorption ménagée ou incomplète, qui permet de s'assurer de la diminution de certains titres tout en conservant des anticorps qu'une absorption poussée éliminerait.

Ainsi les tableaux mettent en évidence dans certains cas l'absorption d'anticorps grâce, soit à une disparition totale du pouvoir agglutinant du sérum après contact avec le culot plaquettaire, soit à une diminution considérable de son titre. De plus, nous avons noté dans chaque cas sur des graphiques plus détaillés, outre les titres obtenus, l'intensité des réactions évaluée par les chiffres de 1 à 5. Ceci est important, car nous avons observé qu'après contact avec un culot plaquettaire, le titre d'un sérum était parfois peu modifié tandis que l'intensité des réactions était très diminuée. On pouvait observer, dans certains cas, des réactions affaiblies à des dilutions élevées.

En tenant compte, d'une part, des tableaux II et IV A, d'autre part de l'affaiblissement prononcé, après absorption, de l'intensité de certaines réactions, nous avons établi les tableaux III et IV B. Sur ces tableaux, qui résument la réaction des différentes fractions absorbées sur les plaquettes des différentes espèces, le signe — figure une absorption totale ou partielle, mais importante, d'anticorps (sauf dans le cas du lapin qui ne possède pas d'antigène correspondant aux anticorps des sérums, puisque ses plaquettes ne sont pas agglutinées par les sérums témoins, avant absorption). Le signe + figure la réaction positive d'agglutination plaquettaire, c'est-à-dire l'absence d'absorption. Les parenthèses expriment un doute. Sur ces tableaux analytiques, les agglutinines contenues dans les immunsérums sont figurées par des minuscules (dernière colonne) auxquelles correspondent des majuscules qui figurent les communautés antigéniques.

Comme dans le cas de l'iso-agglutination des globules rouges de mouton, la règle des affinités antigéniques différentes paraît valable pour expliquer les erreurs existant par défaut d'agglutination directe (Cf. Millot et Eyquem, *Rev. Path. gén. comp.*). Des plaquettes sanguines, possédant des antigènes faibles, seraient non agglutinables par réaction directe, mais capables d'absorber les anticorps une fois réunies en culot plaquettaire. Ces antigènes faibles dont l'existence est révélée par absorption sont figurés en pointillé. Ce serait le cas pour la communauté A chez le porc et le chien ou D chez le mouton et la chèvre

(sérum 384, 385). Les faibles titres sériques sont vraisemblablement responsables de ce phénomène. A ce sujet, une remarque s'impose : tandis que l'antigène D paraît fort chez le cheval

TABLEAU III.

384		SUSPENSIONS PLAQUETTAIRES	BOEUF	MOUTON	CHÈVRE	PORC	CHEVAL	CHIEN	LAPIN	
ANTIGÈNES			A	A	-	△	-	△	-	← anticorps
			B	-	-	-	-	-	-	
			-	C	C	-	C	C	-	
			-	D	D	D	D	-	-	
		SÉRUM NON ABSORBÉ	+	+	+	+	+	+	-	abd
RÉACTIONS DES FRACTIONS ABSORBÉES	BOEUF		-	+	-	(+)	+	-	-	cd
	MOUTON		+	(-)	-	(-)	-	-	-	c
	CHÈVRE		+	+	-	(-)	-	-	-	ab
	PORC		+	+	-	-	+	(-)	-	bc
	CHEVAL		+	(+)	(-)	-	-	(-)	-	ab
	CHIEN		+	-	-	+	+	-	-	bd

381		SUSPENSIONS PLAQUETTAIRES	BOEUF	MOUTON	CHÈVRE	PORC	CHEVAL	CHIEN	LAPIN	
ANTIGÈNES			△	△	-	△	-	A	-	← anticorps
			-	D	D	D	D	-	-	
			-	-	-	P	-	-	-	
		SÉRUM NON ABSORBÉ	+	+	+	+	+	+	-	apd
RÉACTIONS DES FRACTIONS ABSORBÉES	BOEUF		-	-	-	+	+	-	-	pd
	MOUTON		-	(-)	-	+	-	(-)	-	p
	CHÈVRE		-	-	-	+	-	+	-	pa
	PORC		-	-	-	-	-	-	-	o
	CHEVAL		-	-	-	(+)	-	(+)	-	pa
	CHIEN		-	(+)	+	+	+	-	-	pd

et le porc, faible chez le mouton et la chèvre, quel que soit le sérum étudié, l'antigène A paraît au contraire de force différente suivant le sérum qui le met en évidence : il paraît fort chez le bœuf et le mouton, faible chez le chien et le porc, si l'on considère le sérum 384, mais relativement au sérum 381 il apparaît, au contraire, fort chez le chien, faible chez le bœuf, le mouton et le porc. Il est possible que la nature différente de l'antigène injecté (thrombocytes de bœuf ou de porc) ou que l'individualité de l'animal sollicité soit en cause. Sans doute, la

communauté A n'est-elle pas exactement la même dans les deux cas. Des sérums plus puissants permettraient probablement de préciser ce point.

L'examen des tableaux III et IV B montre l'existence simultanée dans les immunsérums de plusieurs agglutinines. Il existerait dans chaque sérum une agglutinine spécifique de l'élément injecté, absorbable seulement par cet élément. C'est le cas de

TABLEAU IV.

A

ABSORPTION		SÉRUM DE LAPIN ANTI-PLAQUETTES DE BŒUF						
385		TITRES VIS-A-VIS DES PLAQUETTES DE :						
		BŒUF	MOUTON	CHÈVRE	PORC	CHEVAL	CHIEN	LAPIN
SÉRUM NON ABSORBÉ		16	8	32	16	8	32	0
SÉRUM ABSORBÉ AVEC 1 ^{re} INJ. DE CULOTS PLQ.	BŒUF	2	32	8	0	16	4	0
	MOUTON	8	4	0	0	0	0	0
	CHÈVRE	8	8	0	4	0	4	0
	PORC	16	4	4	0	2	16	0
	CHEVAL	16	2	0	2	0	2	0

B

385		BŒUF	MOUTON	CHÈVRE	PORC	CHEVAL	CHIEN	LAPIN	
SUSPENSIONS PLAQUETTAIRES									
ANTIGÈNES		A	A	—	△	—	△	—	anticorps
		B	—	—	—	—	—	—	
		—	C	○	—	C	○	—	
SÉRUM NON ABSORBÉ		+	+	+	+	+	+	—	abc
RÉACTION DES FRICTIONS ABSORBÉES	BŒUF	—	+	(—)	—	+	—	—	c
	MOUTON	+	—	—	—	—	—	—	b
	CHÈVRE	+	(+)	—	—	—	—	—	a'b
	PORC	+	(+)	(—)	—	(—)	(+)	—	bc?
	CHEVAL	+	—	—	—	—	(—)	—	b

l'agglutinine anti-plaquettes de bœuf des sérums 384 et 385, que nous avons nommée arbitrairement b, et de l'agglutinine anti-plaquettes de porc du sérum 381 que nous avons désignée par p. D'autres agglutinines correspondraient à divers antigènes communs aux plaquettes sanguines de plusieurs espèces. Elles pourraient être rencontrées dans divers immunsérums de lapin. Nous avons arbitrairement dénommé : A, C, D, les communautés antigéniques correspondantes. La première existerait chez le bœuf,

le mouton, le porc, le chien ; la deuxième chez le cheval, le mouton, la chèvre, le chien ; la troisième chez le cheval, le porc le mouton, la chèvre. On voit sur les tableaux que les trois lapins ont élaboré les agglutinines suivantes : 384 abcd, 385 abc, 381 apd.

Nous ne savons pas encore si ces communautés sont parfaitement définies par l'impossibilité d'une absorption croisée des anticorps ou si elles représentent des parentés immunologiques plus étroites, que l'absorption ménagée peut seule mettre en évidence, l'augmentation du volume de culot plaquettaire suffisant dans ce cas à absorber toute agglutinine.

L'examen des fractions absorbées des sérums de lapin anti-plaquettes de bœuf et de porc vis-à-vis de plaquettes humaines révèle l'existence sur celles-ci, de l'antigène P propre aux plaquettes de porc et l'absence de l'antigène B, propre aux plaquettes de bœuf. La présence de l'antigène C est probable, celle des antigènes A et D est problématique.

RÉSUMÉ.

L'étude comparative de l'activité agglutinante de sérums purs ou de fractions absorbées sélectivement d'hétéro-immunsérum permet de mettre en évidence les cinq fractions antigéniques suivantes :

- A, commune aux plaquettes de bœuf, mouton, porc, chien ;
- B, particulière au bœuf ;
- C, commune aux plaquettes de mouton, chèvre, cheval.
- D, commune aux plaquettes de porc, cheval, mouton, chèvre ;
- P, propre au porc.

Les antigènes C et P existent sur les plaquettes humaines. La présence de D est improbable. L'antigène B est absent.

Pour les globules blancs, il existe entre autres une communauté antigénique entre les globules blancs humains et les globules blancs de cheval.

SUMMARY.

The comparative study of the agglutinating activity of pure sera or of fractions of hetero-immune serum selectively absorbed allows the demonstration of the following five antigenic fractions :

- A, common to the blood platelets of sheep, goat, horse ;
- B, restricted to bovines ;
- C, common to the blood platelets of sheep, goat, horse ;
- D, common to the blood platelets of pig, horse, sheep, goat ;
- P, restricted to the pig.

The antigens C and P exist on human blood platelets. The presence of antigen D is improbable. Antigen B is absent.

As for the white cells, there is an antigenic relationship between human leucocytes and those of the horse.

BIBLIOGRAPHIE

- J. F. ACKROYD. *Brit. med. Bull.*, 1955, **11**, 21.
- J. F. ACKROYD. *Brit. med. Bull.*, 1955, **11**, 28.
- E. ADELSON et M. STEFANINI. *Blood*, 1952, **7**, 700-709.
- ADLER. *J. Immunol.*, 1955, **74**, 61.
- D. B. AMOS. *Brit. J. exp. Path.*, 1953, **34**, 464.
- L. BERMAN, A. R. AXELROD, H. L. GOODMAN et R. T. McCLAUGHRY. *Am. J. clin. Path.*, 1950, **20**, 403.
- A. E. CARRERA, M. V. REID et N. B. KURNICK. *Blood*, 1954, **9**, 1165.
- J. BERNARD, P. GRABAR et M. SELIGMANN. *Bull. Mém. Soc. Med. Hôp. Paris*, 1954, n° 32-33-34, 1169.
- A. CAJANO, J. F. ROSS et S. C. FINCH. V° Congrès Int. Hémat., Paris, 1954.
- A. L. COPLEY et R. B. HOULIHAN. *Blood*, 1947, **1**, 182.
- J. DAUSSET. *Immuno-Hématologie Clinique et Biologique*. Flammarion (à paraître 1956).
- L. DMOCHOWSKI. *Z. Immun. Forsch.*, 1938, **93**, 311.
- R. DUJARRIC DE LA RIVIÈRE et A. EYQUEM. *Les groupes sanguins chez les animaux*. Flammarion, édit., Paris, 1953, 406 pages.
- R. DUJARRIC DE LA RIVIÈRE, M. SAINT-PAUL et A. EYQUEM. *C. R. Acad. Sci.*, 1955.
- J. GUREVITCH et D. NELKEN. *Le Sang*, 1955, 113.
- W. J. HARRINGTON, J. W. HOLLINGSWORTH et C. V. MOORE. *J. Lab. Clin. Med.*, 1951, **38**.
- J. H. HUMPHREY. *Nature*, 1955, **176**, 38.
- F. KISSMEYER-NIELSEN. *Acta Haematol.*, 1953, **9**, 337.
- E. MALINVAUD et J. DAUSSET. *Le Sang*, 1955, **26**, 123.
- B. MAUPIN. *Les Plaquettes sanguines de l'homme*. Masson et C^{ie}, éd., Paris, 1954.
- P. MIESCHER et A. MIESCHER. *Allergie*, 1954, **3**, 9.
- P. MIESCHER, M. FAUCONNET et TH. BERAUD. *Exp. Med. Surg.*, 1953, **41**, 173.
- P. MIESCHER et M. FAUCONNET. *J. suisse de Méd.*, 1954, **84**, 1036.
- P. MILLOT et A. EYQUEM. *Rev. Path. gén. comp.*, 1955, **55**, 1245 et 1956, **56** (à paraître).
- S. MOESCHLIN et R. MORENO. *Klin. Wsch.*, 1954, **32**, 799.
- P. MOUREAU et ANDRE. *Vox sanguinis*, 1954, **4**, 46.
- J. MOULINIER et F. MESNIER. *Rev. Belge Path. Méd. exp.*, 1955, **24**, 273.
- W. J. NUNGESTER, J. D. GORDON et F. E. COLLINS. *J. Infect. Dis.*, 1950, **87**, 71-77.
- M. NINNI. *Haematol.*, 1952, **36**, 693.
- R. HOIGNÉ et H. STORCK. *Schw. med. Wschr.*, 1953, **83**, 718 et 721.
- S. C. FINCH, J. F. ROSS, F. G. EBAUGH. *J. Lab. Clin. med.*, 1953, **42**, 555.

- P. RUGGIERI et M. MARCHI. *Boll. Soc. ital. Ematol.*, 1955, **3**, 148.
- M. SAINT-PAUL, J. Mc A'NULTY et W. C. MOLONEY. *Proc. nat. Meet. Am. Fed. clin. Res.*, 1952, Résumé 96.
- M. SAINT-PAUL et A. EYQUEM. V^e Congrès Int. Hématol., Paris 1954.
- A. J. SAUER et J. J. VAN LOGHEM Jr. *Vox sanguinis*, 1954, **4**, 120.
- M. SELIGMANN, P. GRABAR et Y. BERNARD. *Le Sang*, 1955, **26**, 52 ; *Ann. Inst. Pasteur*, 1955, **88**, 546.
- M. STEFANINI. *Le Sang*, 1955, **26**, 83.
- L. M. TOCANTINS. *Medicine*, 1938, **47**, 155-260.
- E. WITEBSKY et K. KOMYIA. *Z. Immun. Forsch.*, 1930, **67**, 280.
- Colloque sur l'Immunologie des leucocytes et des plaquettes*, tenu le 17 janvier 1955 à Paris, au Centre national de Transfusion sanguine, sous l'égide de la Société française d'Hématologie. *Sem. Hôp.*, 1955, n° 5.

PRÉSENCE DES ANTIGÈNES J, R ET A DANS LE SÉRUM DE L'HOMME ET DES MAMMIFÈRES

par A. EYQUEM et M^{me} L. PODLIACHOUK (*)

*(Laboratoire d'Hématologie et des Groupes Sanguins.
Centre d'Etudes des Groupes Sanguins des Animaux
[Service de M. R. DUJARRIC DE LA RIVIÈRE])*

En dehors des antigènes érythrocytaires déterminant les groupes sanguins, on a individualisé des substances solubles ayant les mêmes caractères antigéniques et qui existent dans les liquides de sécrétions (Landsteiner et Levine) et dans le sérum (Moss, 1910 ; Grafe et Graham, 1911 ; Schiff, 1924).

Chez les bovins, seul parmi les nombreux antigènes érythrocytaires individualisés, l'antigène J (découvert par Stormont) est décelable dans le sérum des animaux J positifs, à l'aide d'une épreuve de l'isohémolysine anti-J (M. Ycas). Cette substance n'a pas de pouvoir antigénique pour le bœuf ou pour le lapin. De même que les extraits érythrocytaires obtenus par extraction à l'alcool et à l'acétone, bien qu'ils aient gardé leur propriété hapténique (Royal, Ferguson, Sutton), cet antigène J se comporte de manière assez particulière puisqu'il n'est pas décelable chez les jeunes veaux nouveau-nés, alors que les mêmes animaux possèdent cet antigène érythrocytaire lorsqu'ils sont âgés de 8 jours (voir Dujarric de la Rivière et Eyquem). Ce caractère reste constant au cours de l'évolution d'un même individu, l'avidité des échantillons érythrocytaires pour des mêmes antisérums ne présentant pas de variation. Il existe, par contre, certaines différences entre les bovins adultes J positifs, dans la réactivité de leurs globules rouges vis-à-vis d'un même lot d'antisérum ; mais elles ne sont pas attribuables à une hétérogénéité qualitativement décelable à l'aide des épreuves d'absorption (Irwin, Stormont, Ferguson). Le taux de substance J dans le plasma ne varie pas chez le même individu.

(*) *Société Française de Microbiologie*, séance du 1^{er} décembre 1955.

On peut considérer que cette substance est élaborée par certains organes et qu'elle se fixe secondairement sur les globules rouges. Ce processus de fixation se réalise aussi au cours de la transfusion de globules rouges J positifs à un bovin J négatif, si bien qu'il est impossible, quatre jours après la transfusion, de distinguer les globules rouges du donneur de ceux du receveur en n'utilisant que les sérums anti-J pour faire une numération sélective.

Les bovins, qui possèdent l'antigène J dans leur plasma, ne le présentent pas tous sur leurs globules. Stone et Irwin ont ainsi distingué trois catégories d'individus :

J^{es} chez lesquels l'antigène existe sur les globules rouges et dans le plasma,

J^s chez lesquels l'antigène existe dans le plasma,

J^a qui ne possèdent pas l'antigène mais peuvent posséder à l'inverse l'isohémolysine anti-J.

L'incompatibilité foeto-maternelle ou l'incompatibilité au cours de transfusions n'entraînent pas d'accidents, notamment lorsque du sang J positif est transfusé à un receveur possédant une isohémolyse anti-J et inversement, car la substance J dissoute dans le plasma du donneur neutralise l'anticorps. Par contre, la transfusion de globules rouges J positifs, lavés et remis en suspension dans de l'eau physiologique, peut entraîner une réaction post-transfusionnelle.

RÉPARTITION DE L'ANTIGÈNE J CHEZ LES BOVINS.

Nous avons étudié le sang de 295 bovins à l'aide de la technique de Ferguson, Stormont et Irwin en pratiquant la réaction d'hémolyse en présence de sérum frais de lapin comme complément. La recherche des isoagglutinines et des iso-hémolysines naturelles nous a montré que, dans la plupart des cas, nous avions individualisé des hémolysines anti-J.

Mais, dans deux cas, nous avons obtenu une hémolysine anti-V, dont l'existence à l'état naturel n'a pas encore été signalée et dont le diagnostic a pu être fait après étalonnage des bovins de référence, à l'aide des sérums aimablement adressés par MM. Irwin et Stormont.

	NOMBRE	J+	J—	p. 100 J+
I. P. Garches et I. N. R. A. . . .	191	76	115	40
R. montbéliarde et tachetée . .	104	24	80	23,1

Deux groupes d'animaux ont été examinés qui appartiennent essentiellement à deux races différentes, pour lesquels nous avons obtenu des résultats qui témoignent d'une différence de répartition entre les deux races.

Chez les mêmes animaux, nous n'avons pas observé, au cours des divers examens, de différence dans la concentration antigénique en antigène J. Il y a, par contre, certaines différences entre les individus, fait déjà noté par Stormont. La recherche de l'isohémolysine anti-J a montré qu'elle existe avec une fréquence assez analogue dans les trois groupes d'animaux J négatifs :

	J—	ANTI-J	p. 100
I N.R.A.	19	9	47,3
R. montbéliarde	80	38	47,5
I. P. Garches	45	18	40

Au cours de l'étude *in vitro* du processus de transformation antigénique des globules rouges J négatifs en J positifs après contact avec du plasma J positif, nous avons observé (1953) que certains bovins possédant l'antigène J dans leur plasma ne le possédaient pas sur leurs globules.

L'étude du sang de 200 animaux a donné la répartition suivante :

33 p. 100 possèdent les antigènes J plasmatique et érythrocytaire ;

25,5 p. 100 possèdent l'antigène plasmatique ;

41,5 p. 100 ne possèdent pas d'antigène J.

Le groupe des animaux classés comme J négatifs d'après l'examen de leurs globules se divise en 62 p. 100 de J négatifs vrais et 38 p. 100 d'individus possédant l'antigène J plasmatique.

Les animaux possédant l'antigène érythrocytaire J ont des globules rouges susceptibles d'inhiber l'hémolysine anti-J ; il en est de même de leur sérum.

Le sérum des animaux J négatifs possédant une hémolysine anti-J ne présente pas de pouvoir inhibiteur. Au contraire, le sérum des animaux J négatifs ne possédant pas d'anticorps anti-J présente, dans 38 p. 100 des cas, le pouvoir d'inhiber l'hémolysine anti-J, inhibition qui est attribuable à un antigène J plasmatique, non décelable sur les globules rouges. L'absence de fixation de l'antigène plasmatique J sur les globules peut être attribuable à la structure superficielle, mise en évidence chez certains bovidés par Coombs, Gleeson-White et Hall.

RÉPARTITION DES ANTIGÈNES BOVIN J, OVIN R ET HUMAIN A
DANS LE SÉRUM DES MAMMIFÈRES.

Les résultats obtenus dans la recherche des antigènes hétérophiles communs au sang de l'homme et de certaines espèces animales, nous ont incités à étudier, chez les mammifères, la répartition de l'antigène J, dont Neimann-Sorensen, Rendel et Stone ont établi la parenté sérologique avec l'antigène R du mouton et A de l'homme.

L'antigène érythrocytaire R est décelable chez le mouton à l'aide d'isohémolysine ou d'isoagglutinine naturelle. Comme l'antigène bovin J, il existe sous forme soluble dans le plasma. Chez l'agneau nouveau-né il existe exclusivement sous cette forme pendant les dix premiers jours de la vie.

Les épreuves d'interabsorption des sérums anti-J, anti-R et anti-A, à l'aide de globules rouges de bœuf J positifs et J négatifs, de mouton R positifs et R négatifs et d'homme A et O ont révélé l'existence de quatre particularités antigéniques : un antigène hétérophile intéressant J, R et A ; un autre intéressant R et A ; de plus, l'agglutinine anti-R active sur les globules rouges humains A peut être inhibée par les antigènes plasmatiques J et R, ainsi que par la substance A salivaire ; l'isoagglutinine anti-A agit sur les globules rouges de bœuf et de mouton sans être influencée par la présence des antigènes J et R (Neimann-Sorensen).

Nous avons recherché les inhibiteurs des anticorps anti-J, anti-R et anti-A, contenus dans le sérum de 53 hommes, 10 bœufs, 6 moutons, 23 chèvres, 19 chiens, 15 cynocéphales, 5 chimpanzés, 27 chevaux, 11 mulets, 12 poules et 9 cobayes. La plupart de ces animaux avaient été étudiés antérieurement et leurs caractères érythrocytaires déterminés (sauf pour les poules et les cobayes).

TECHNIQUES.

Trois types d'anticorps ont été utilisés :

1° Anti-J hémolysine bovine naturelle titrant originellement 1/64 ;

2° Anti-R agglutinine naturelle d'origine ovine (désignée par anti-A au cours de l'étude de P. Millot) ;

3° Anti-A agglutinine humaine titrant 1/128, de façon à éviter l'intervention d'immunagglutinine difficilement absorbable.

La recherche des substances inhibitrices de ces anticorps est parfois gênée par l'existence d'hémolysines ou d'agglutinines hétérospécifiques.

Les hémolysines anti-bœuf n'existent pas chez les chevaux, mulets, poules, cobayes, moutons ; elles existent chez les chiens.

Les agglutinines anti-mouton existent chez les bœufs, les chiens, les cynocéphales et les chimpanzés et, à un faible titre, chez certaines chèvres. Dans ce cas, les épreuves d'inhibition ont été réalisées après absorption des hétéro-anticorps.

BOEUFs. — Sur 10 bœufs, 5 possèdent dans leur sérum la substance J et inhibent l'isohémolysine bovine anti-J. Parmi eux, 4 possèdent un sérum inhibant l'agglutinine anti-R. Parmi les 5 qui ne possèdent pas l'antigène plasmatique J, un seul a un sérum qui inhibe l'agglutinine anti-R. Aucun de ces 10 sérums n'inhibe l'agglutinine humaine anti-A.

MOUTONS. — Parmi les 6 moutons examinés, 2 inhibent les anticorps anti-R et anti-J ; aucun n'inhibe l'agglutinine humaine anti-A, résultat à rapprocher de ceux obtenus par Friedenreich (1937) qui a observé l'absence dans les organes et sécrétions des moutons de l'antigène A, cependant présent sur leurs globules rouges.

CHIENS. — Le sérum de certains chiens, contenant une agglutinine anti-humaine, a été absorbé au préalable à l'aide de globules rouges humains O, pendant deux heures à 4°.

Aucun des 19 chiens examinés ne possède dans son sérum la propriété d'inhiber l'agglutinine anti-A ; 6 d'entre eux possèdent une substance inhibant l'agglutinine ovine anti-R et l'hémolysine bovine anti-J, et ne possèdent pas d'agglutinine spécifique des globules rouges humains A.

Treize animaux possèdent une agglutinine anti-A et n'ont pas d'inhibiteur des anticorps anti-J et anti-R.

CHÈVRES. — Les 23 chèvres examinées ne possèdent pas de propriétés sériques inhibitrices de l'agglutinine humaine anti-A ; 6 d'entre elles inhibent les anticorps anti-J et anti-R.

CYNOCÉPHALES. — Parmi les 15 cynocéphales examinés, 10 inhibent l'hémolysine anti-J et l'agglutinine anti-A ; 8 d'entre eux possèdent une agglutinine anti-B et aucun une agglutinine anti-A (Fine et Eyquem).

Des 5 animaux ne neutralisant pas l'agglutinine anti-A, 4 possèdent une agglutinine anti-A.

L'activité inhibitrice vis-à-vis de l'agglutinine anti-R, recherchée après absorption des hétéroagglutinines anti-mouton, a montré chez tous les animaux, sauf un, l'identité des réactions : tous les animaux possédant un inhibiteur de l'hémolysine anti-J en ont un pour l'agglutinine anti-R. Un seul animal inhibe l'anti-R, sans inhiber l'anti-J.

CHIMPANZÉS. — Cinq chimpanzés possèdent en même temps une agglutinine active sur les globules rouges humains B titrant 1/8 à 1/32, un inhibiteur de l'hémolysine anti-J et de l'agglutinine anti-A.

Après absorption des hétéro-agglutinines anti-mouton, à l'aide de globules rouges de mouton R négatifs, on révèle la présence d'un inhibiteur de l'agglutinine anti-R.

On peut admettre, en évaluant le pouvoir de neutralisation, que cet inhibiteur du sérum de chimpanzé se rapproche de l'antigène humain A, tandis que celui du cynocéphale se rapproche de la substance ovine R, car il inhibe faiblement l'agglutinine anti-A.

HOMMES. — Parmi 53 hommes adultes normaux :

Groupe O. — Les 27 individus examinés n'ont pas d'inhibiteur pour l'anti-R ou anti-J.

Groupe A. — Sur 26 individus, 24 ont un inhibiteur pour l'anti-J ; 2 n'en ont pas ; sur 6 individus, 4 ont un inhibiteur de l'anti-R ; 2, qui n'ont pas d'inhibiteur de l'anti-R, n'ont qu'un faible pouvoir inhibiteur pour l'isoagglutinine humaine anti-A.

★ ★

Bien que de nombreux antigènes hétérophiles aient déjà été individualisés, l'étude de la répartition des inhibiteurs pour anti-J, anti-R et anti-A montre leur présence dans différentes espèces animales qui peuvent être groupées en tenant compte que l'examen du sérum de chevaux, mulets, poules, cobayes n'a pas révélé d'inhibiteur :

	J	R	A
Poule	—	—	—
Cheval	—	—	—
Mulet	—	—	—
Cobaye	—	—	—
Bœuf	+	±	—
Mouton	+	+	—
Chèvre	+	+	—
Chien	+	+	—
Cynocéphale	+	+	±
Chimpanzé	+	+	+
Homme	+	+	+

Les antigènes hétérophiles individualisés sont indépendants du système Forssman, car l'extrait de rein de cheval n'absorbe pas l'hémolysine anti-J.

Il est assez étonnant de voir que le sérum des chevaux et des cobayes ne contient pas de substance J, R ou A, car leurs sécrétions et leurs organes sont riches en substance A ou B, qui, il est vrai, sont absentes de leurs globules rouges.

On peut considérer que l'étude de ces antigènes sériques doit permettre de préciser certains aspects du métabolisme des hexosamines, dont un certain nombre sont révélables par leurs caractères sérologiques. Il est probable que celles qui se trouvent sous forme soluble dans le plasma sont plus rapidement métabolisées que celles qui se trouvent dans les produits de sécrétion.

Les antigènes J, R et A doivent être rapprochés des antigènes Lewis^a et Lewis^b qui peuvent aussi se fixer secondairement sur les globules rouges (J. Sneath et P. Sneath).

RÉSUMÉ.

L'examen de 200 bovins a montré que 33 p. 100 d'entre eux possèdent les antigènes plasmatiques et érythrocytaires, 25,5 p. 100 possèdent l'antigène plasmatique et 41,5 p. 100 ne possèdent pas d'antigène J. Environ 40 p. 100 des animaux J négatifs possèdent une isohémolysine anti-J.

La recherche dans le sérum des animaux des inhibiteurs de l'hémolysine bovine anti-J, de l'agglutinine ovine anti-R et humaine anti-A permet de classer les mammifères en quatre groupes :

1° Le cheval, le mulet, le cobaye ne possèdent pas d'inhibiteurs homologues à ces anticorps.

2° Le bœuf possède dans certains cas un inhibiteur pour anti-J.

3° Certains moutons possèdent un inhibiteur pour anti-J et anti-R, de même que certaines chèvres et certains chiens.

4° Les hommes du groupe A et les chimpanzés, de même que certains cynocéphales possèdent un inhibiteur pour les trois anticorps.

SUMMARY.

The study of 200 bovines has shown that 33 % of them possess plasmatic and erythrocytic antigens, 25.5 % possess the plasmatic antigen, and 41.5 % do not possess antigen J. About 40 % of the J negative animals possess an iso-haemolysin anti-J.

The search in the serum of animals for the inhibitors of bovine anti-J haemolysin, of sheep anti-R and human anti-A agglutinins, has allowed the classification of the mammals into four groups :

1° The horse, mule, guinea-pig do not possess homologous inhibitors for these antibodies.

2° Certain bovines possess an inhibitor for anti-J.

3° Certain sheep, goats and dogs possess an inhibitor for anti-J and anti-R.

4° Man of group A and chimpanzees, as also certain cynocephales, possess an inhibitor for the three antibodies.

Nous remercions nos collaborateurs les médecins vétérinaires Millot, Girard et Corvazier, d'avoir prélevé le sang des bovins appartenant à l'Institut Pasteur et l'I. N. R. A., et le médecin vétérinaire Rossi de nous avoir fourni le sang des bovins de race montbéliarde.

BIBLIOGRAPHIE

- R. DUJARRIC DE LA RIVIÈRE et A. EYQUEM. *Les groupes sanguins chez les animaux*. Flammarion, édit. Paris, 1953, 407 pages.
- T. ANDERSON. *Z. Rassenphys.*, 1938, **10**, 88.
- R. R. A. COOMBS, M. H. GLEESON-WHITE, J. G. HALL. *Brit. J. exp. Path.*, 1951, **32**, 195.
- L. C. FERGUSON. *J. Immunol.*, 1941, **40**, 213.
- L. C. FERGUSON, C. STORMONT et M. R. IRWIN. *J. Immunol.*, 1942, **44**, 147.
- J. FINE et A. EYQUEM. *Ann. Inst. Pasteur*, 1955 (sous presse).
- V. FRIEDENREICH et G. THYSEN. *C. R. Soc. Biol.*, 1937, **126**, 801.
- LEVINE. *J. Hered.*, 1948, **39**, 285.
- P. MILLOT et A. EYQUEM. *Rev. Pathol.*, 1955, **672**, 1245.
- A. NEIMANN-SØRENSEN, J. RENDEL et W. M. STONE. *J. Immunol.*, 1954, **73**, 407.
- J. RENDEL, A. NEIMANN-SØRENSEN et M. R. IRWIN. *Genetics*, 1954, **39**, 396.
- G. C. ROYAL, L. C. FERGUSON et T. S. SUTTON. *J. Immunol.*, 1953, **71**, 22.
- J. S. SNEATH et P. H. A. SNEATH. *Nature*, 1955, **176**, 172.
- W. M. STONE et M. R. IRWIN. *J. Immunol.*, 1954, **73**, 397.
- C. STORMONT. *Proc. Nat. Acad. Sci.*, New-York, 1949, **35**, 232.
- C. STORMONT. *Genetics*, 1950, **35**, 76.
- M. YCAS. *J. Immunol.*, 1949, **61**, 327.

EMPLOI DE COLORANTS DANS L'ANALYSE ÉLECTROPHORÉTIQUE ET IMMUNO ÉLECTROPHORÉTIQUE EN MILIEU GÉLIÉ

par J. URIEL (*) et P. GRABAR (**).

(Institut Pasteur, Service de Chimie Microbienne)

L'analyse électrophorétique en milieu gélifié présente un certain nombre d'avantages [10], dont le principal est dû à la forte teneur du gel en liquide (de l'ordre de 98-99 p. 100). L'électrophorèse se produit donc presque comme en milieu liquide, mais à la fin de l'électrophorèse, les constituants ne se remélangent pas, puisque leur diffusion est retardée dans le gel. On peut donc les isoler ou les caractériser sur place.

Dans la méthode immuno-électrophorétique [9], cette caractérisation est effectuée par des immunosérums précipitants. Cette méthode a permis déjà l'obtention de nombreux renseignements intéressants.

Cependant, d'autres moyens de caractériser les constituants d'un mélange, séparés par l'électrophorèse, peuvent être envisagés. Gordon et ses coll. [10] étudient l'absorption U. V. ou appliquent des bandes de papier-filtre sur le gel et colorent ensuite ces bandes, comme dans l'électrophorèse sur papier. La technique très simple de séchage des plaques de gel de gélose élaborée par Uriel et Scheidegger a permis d'effectuer des colorations directement sur les feuilles transparentes de gélose ainsi obtenues [22]. Depuis cette publication, divers perfectionnements des techniques de coloration ont été réalisés. De plus, des techniques analogues ont pu être élaborées pour la coloration des bandes de précipités spécifiques qui se forment dans l'analyse immuno-électrophorétique. Ces techniques diffèrent de celles décrites par Bjorklund [2] pour la coloration des précipités spécifiques que l'on obtient dans la méthode d'Ouchterlony.

Dans ce qui suit, nous décrivons successivement les techniques de fixation et de séchage du gel, puis celles de caractérisation des protéines, lipides, glucides et phospholipides.

(*) Stagiaire de Recherches de l'Institut National d'Hygiène, Directeur : professeur L. Bugnard.

(**) Manuscrit reçu le 17 décembre 1955.

I. — FIXATION.

Elle a pour but d'immobiliser dans le gel les constituants séparés par l'électrophorèse. Pour cela, les plaques de gélose, débarrassées de leurs bouts de papier filtre sont trempées dans un bain fixateur.

La nature du fixateur doit, naturellement, être en rapport avec celle des constituants qu'on veut précipiter et aussi ne pas être gênante pour les réactions de caractérisation chimique des constituants que l'on se propose d'utiliser.

Pour les protéines plasmatiques, celles du blanc d'œuf et du L. C. R., nous avons employé une solution d'alcool à 60 p. 100 contenant 2 p. 100 d'acide acétique concentré, ou simplement une solution d'acide acétique M/5. La solution alcool-acide rend plus rapide la dessiccation ultérieure du gel, mais l'acide acétique seul constitue un traitement moins drastique. L'expérience nous a montré que la durée de la fixation ne doit pas être inférieure à trois heures, mais un temps plus prolongé atteignant même vingt-quatre heures ne gêne pas les opérations ultérieures.

Dans le cas de l'analyse immuno-électrophorétique, des lignes de précipitation se forment dans le gel par suite de la réaction des antigènes, séparés électrophorétiquement, avec des anticorps homologues. La fixation n'est pas nécessaire, mais il faut laver les plaques pendant trois jours dans l'eau physiologique renouvelée une ou deux fois par jour, dans le but d'éliminer les protéines qui n'ont pas participé à la réaction immunochimique.

II. — DESSICCATION.

Nous rappelons la technique déjà publiée ailleurs [22], puisqu'elle fait partie du procédé d'ensemble.

Sur les plaques de gélose, retirées du fixateur, on applique une bande de papier-filtre et on laisse la dessiccation se faire, soit à la température ambiante, soit, pour aller plus vite, dans l'étuve à 37° C ou sous un courant d'air [22].

L'avantage de cette opération réside dans le fait que le papier-filtre, en laissant toujours humide la surface du gel, permet une dessiccation graduelle et régulière et évite l'apparition dans les plaques de craquelures, accident habituel quand on laisse la gélose se dessécher à l'air. De plus, le papier-filtre absorbe l'excès des sels qui imbibent encore le gel et qui risqueraient de cristalliser.

Quand la dessiccation est terminée, on enlève le papier-filtre. La plaque de gélose, primitivement de 3 à 4 mm d'épaisseur, est réduite à une mince feuille collée à la plaque de verre qui lui sert de support. Le film de gélose, qui contient les consti-

tuants protéiques précipités dans le temps précédent, se comporte comme une coupe de tissu et se prête ainsi à l'adaptation de la plupart des réactions utilisées en histochimie.

III. — RÉACTIONS DE CARACTÉRISATION.

1° COLORATION GÉNÉRALE DES PROTÉINES. — Un nombre assez considérable d'indicateurs de la série des sulfophthaléines (bleu de bromophénol, vert de bromo-crésol, bleu de bromo-thymol, etc.), ainsi que l'amidoschwarz et l'azocarmin, ont été essayés. Nous les avons employés dans des solvants divers : le méthanol, l'alcool éthylique, des solutions aqueuses saturées de Cl_2Hg : mais les meilleurs résultats ont été obtenus avec des solutions aqueuses faiblement tamponnées.

En ce qui concerne l'amidoschwarz et l'azocarmin, leurs solutions dans le méthanol sont d'un usage courant [11, 21]. Pourtant, on doit remarquer que si, en histochimie, l'emploi des colorants dans des solvants organiques est justifié par le fait qu'ils doivent pénétrer des structures particulières, parfois difficilement accessibles, ce n'est pas le cas dans l'électrophorèse en gélose ou sur papier. D'autre part, les solutions aqueuses des colorants ont des avantages bien connus.

A pH acide et faible force ionique, les solutions que nous avons étudiées se conservent bien ; elles donnent des colorations nettes et aisément reproductibles ; il est facile d'éliminer l'excès de colorant par simple lavage à l'eau acidifiée ; ainsi obtient-on un fond incolore et transparent qui se prête bien aux mesures photométriques. Il n'y a pas à craindre d'accident de surcoloration. D'autre part, la facile réversibilité des colorations (il suffit de laver dans du tampon véronal à pH 8,6 ou dans de la soude N/50 pour décolorer les plaques) plaide en faveur de l'absence de phénomènes de dénaturation, qui sont habituels avec l'emploi de solvants organiques ou même de solutions aqueuses saturées par du Cl_2Hg .

Parmi les colorants essayés, ceux qui donnent les résultats les plus constants sont, pour les plaques d'électrophorèse simple, l'amidoschwarz et, pour les bandes de précipités spécifiques dans l'analyse immuno-électrophorétique, l'azocarmin (voir planche, fig. A et E). Nous les employons tous deux sous la forme suivante :

Amidoschwarz ou azocarmin	1 g
Acide acétique 1 M	450 ml
Acétate de Na 0,1 M	450 ml
Glycérol	100 ml

La durée de la coloration est de quatre heures. Nous faisons le lavage avec une solution d'eau distillée contenant 2 p. 100

d'acide acétique concentré et 15 p. 100 de glycérol. Deux bains successifs d'une heure suffisent pour décolorer complètement le fond de gélose.

Après le lavage, les plaques sont séchées à l'étuve à 37° C. Finalement, grâce à la glycérine ajoutée tant dans la solution colorante que dans l'eau de lavage, on peut décoller la feuille de gélose de son support de verre. La glycérine, dans la proportion indiquée, lui donne une consistance qui la rend très maniable et permet sa conservation indéfinie.

2° COLORATION DES LIPIDES ET LIPOPROTÉINES. — Nous avons essayé le noir Soudan, l'Oil Red O, l'écarlate R Geigy et le Soudan IV. Tous ces colorants étant insolubles dans l'eau, il est indispensable, pour éviter des précipitations non spécifiques, que les plaques soient parfaitement sèches.

Le temps optimum de coloration varie considérablement selon qu'on emploie le noir Soudan ou la série des Soudans rouges. En général, avec le Soudan noir, en solution saturée dans l'alcool à 60 p. 100 [20], une à deux heures suffisent pour obtenir une bonne coloration de tous les composants soudanophiles. Au delà de deux heures, l'intensité de la coloration augmente légèrement, mais on ne décele par de nouvelles fractions ou lignes de précipités spécifiques. Avec les Soudans rouges [6] également en solution dans l'alcool à 60 p. 100, il faut prolonger la coloration entre douze et vingt-quatre heures.

Après coloration, les plaques sont lavées par deux bains de quinze minutes dans l'alcool à 50 p. 100 et ensuite séchées à l'étuve à 37° C. Finalement, si on veut décoller le film de gélose déjà coloré, on trempe les plaques pendant quatre heures dans de l'eau contenant 15 p. 100 de glycérine, et on sèche de nouveau à l'étuve à 37° C (voir planche, fig. D et F).

Pour la réalisation pratique de la coloration, nous procédons de la façon suivante :

On renverse la plaque de verre de manière que le film de gélose soit à la face inférieure, on appuie ses extrémités sur deux minces lamelles de bois (1 mm d'épaisseur environ) placées sur le fond d'une cuvette en porcelaine et on laisse s'étaler le colorant dans l'espace libre qui reste entre la surface de la gélose et le fond de la cuvette.

Nous employons le même procédé dans tous les cas où il y a intérêt à économiser les réactifs ou danger d'altération par action de l'oxygène atmosphérique, ou encore risque de pertes quand il s'agit de solvants très volatils.

Un rapport plus détaillé sur la coloration des lipoprotéines séparées par électrophorèse simple et par l'analyse immuno-

électrophorétique en gélose, concernant les protéines sériques et celles du L. C.-R., est donné dans d'autres publications [8, 23].

3° COLORATION DES GLYCOPROTÉINES. — L'acide periodique (agent oxydant utilisé par Malaprade [1928] pour l'estimation analytique des glycols) combiné avec la fuchsine sulfitée de Schiff a été introduit par MacMannus [17] et Hotchkiss [12] pour la démonstration histochimique d'une variété de composants à caractère polyosidique.

Lors de l'adaptation de cette réaction à l'étude des glycoprotéines séparées par électrophorèse ou immuno-électrophorèse en gélose (Koiv [13] l'a déjà appliquée à l'électrophorèse sur papier), nous avons eu à préciser les différents facteurs qui interviennent dans la préparation des réactifs et la réaction elle-même, afin de fixer les meilleures conditions pour le contrôle et la reproductibilité des résultats.

A. *Le réactif de Schiff*. — La fuchsine basique traitée par l'acide sulfureux (réactif de Schiff) se décolore avec formation de l'acide parafuchsine leuco-C-sulfonique N-sulfinique [24]. Celui-ci donne en présence d'un aldéhyde un composé d'addition coloré en rouge violet, dont le spectre d'absorption n'est pas le même que celui de la fuchsine initiale.

Deux aspects différents doivent être envisagés en ce qui concerne la préparation du réactif de Schiff : la stabilité du réactif et sa sensibilité :

a) Depuis l'utilisation par Coleman [3] du charbon animal pour enlever un colorant résiduel présent dans la fuchsine du commerce, et qui ne réagit pas avec le SO_3H_2 , l'obtention de solutions de Schiff incolores et stables ne présente guère de difficultés. Il suffit, une fois le leucodérivé obtenu, d'avoir dans la solution un léger excès d'acide sulfureux.

Mais, précisément cette même facilité permet la préparation de réactifs de Schiff de caractéristiques très différentes (1). Or des proportions absolues et relatives de fuchsine, de SO_2 libre et d'acidité, dépendent la stabilité et la sensibilité du réactif. En ce qui concerne la première, et selon nos propres données, le léger excès de SO_2 nécessaire pour rendre stable la fuchsine décolorée diminue au fur et à mesure que l'acidité augmente et vice versa. Pour une acidité 0,1 N en ClH , et en présence de 300 mg p. 100

(1) Ainsi, parmi les nombreuses formules qui ont été décrites, Longley [16] constate, pour le même volume de réactif — 100 ml — des variations dans la teneur en fuchsine allant de 100 à 1 000 mg, en acidité de 0 à 15 ml ClH N/1, et dans les rapports sulfite/fuchsine de 3,5 à 30.

de fuchsine, 3 mMol de SO_2 libre par 100 ml de solution sont nécessaires et suffisantes.

En tout cas, le plus important, quelle que soit la formule de R. de Schiff choisie, est de connaître, avant tout emploi, sa concentration en fuchsine, son acidité et sa teneur en SO_2 libre.

b) La sensibilité d'une même solution de Schiff varie envers les différents types d'aldéhydes. Ce fait déjà connu depuis longtemps a été bien établi en chimie analytique. Par contre, en histochimie, où le réactif de Schiff a été largement employé, peu de travaux [4, 7, 16] sont consacrés à l'étude systématique de cet aspect de la question. De plus, les conclusions s'interprètent avec difficulté ou s'accordent mal pour deux raisons : l'utilisation de réactifs de Schiff très divers dans leur composition finale, et l'emploi pour le contrôle de la sensibilité de produits purs ou simples, parmi lesquels souvent le formaldéhyde, qui présente par rapport à la plupart des aldéhydes un comportement exceptionnel dans sa réaction avec le réactif de Schiff [19]. Or, on a affaire dans les études sur le sérum ou les recherches histo-chimiques à des structures hétérogènes engagées par des liaisons complexes (glyco- et lipoprotéines) et l'expérience montre que les groupements fonctionnels environnants soit libres, soit démasqués lors des traitements préalables au réactif de Schiff, peuvent jouer un rôle important dans la marche de la réaction. Il semble donc plus rationnel d'ajuster la sensibilité du Schiff dans chaque cas particulier et de préciser exactement les conditions de travail et les limites d'interprétation de la réaction.

Nous avons étudié la sensibilité d'une solution de réactif de Schiff du point de vue de la rapidité de la réaction et de l'intensité des complexes colorés qui se forment. En général, la vitesse de la réaction augmente quand la teneur en SO_2 libre et l'acidité du Schiff diminuent jusqu'à un optimum compatible avec la possibilité de la réaction et la stabilité du réactif. Pour les aldéhydes libérés à partir des groupements 1,2-glycols des polyosides et des glycoprotéines, cet optimum se situe entre 1-2 mMol de SO_2 libre par 100 ml de réactif et pour une acidité en ClH de 0,05-0,1 M. La concentration en fuchsine semble être moins importante ; ceci s'accorde avec les résultats de Longley [16].

Dans ces conditions, deux à trois minutes de contact avec le réactif suffisent pour atteindre le maximum d'intensité. Un contact plus prolongé accentue la coloration du fait que le fond de gélose commence à réagir.

Si, pour une même concentration en fuchsine, on augmente parallèlement l'acidité et la teneur en SO_2 libre, ou cette dernière seulement, la vitesse de la réaction est progressivement ralentie, mais qualitativement le résultat est le même. Par contre, si, avec

une faible teneur en SO_2 libre, on accroît l'acidité, il arrive un moment où la réaction ne se fait plus (2).

En résumé, la sensibilité est fonction des proportions absolues et relatives en SO_2 libre, en acidité et en fuchsine. On peut agir sur ces trois variables et arriver à la préparation de réactifs de Schiff de sensibilités différentes.

L'intérêt, en ce qui concerne l'électrophorèse en gélose, de pouvoir obtenir la coloration par de courts temps de contact entre le réactif de Schiff et les produits en étude se justifie par le fait que le réactif lui-même peut hydrolyser certains composants, tels les acétal phosphatides, et fausser ainsi les résultats. De plus, cela facilite le lavage nécessaire pour enlever l'excès de réactif et obtenir des préparations durables.

B. *L'acide periodique*. — Comme nous n'avons affaire qu'à des complexes glucides-protéines, précipités à l'avance, nous employons l'acide periodique en solution aqueuse à 1 p. 100 [12] et un simple lavage à l'eau courante pour enlever l'excès.

L'utilisation d'un bain réducteur après l'oxydation des polysaccharides par l'acide periodique [12] a été justement critiquée [15]. D'ailleurs, sur les plaques d'électrophorèse elle est superflue en raison de l'absence de cations métalliques capables de former des periodates insolubles et ceux-ci capables à leur tour de recolorer la fuchsine.

C. *Elimination de l'excès de réactif de Schiff*. — Le ringage par une solution d'acide sulfureux pour enlever l'excès de réactif de Schiff, préconisé par Feulgen, s'est généralisé dans les travaux histochimiques. Lison (1953) a souligné l'importance primordiale de ce lavage par l'acide sulfureux avant le traitement par l'eau. En effet, en présence d'eau, la fuchsine se reforme par oxydation à partir du réactif de Schiff, et en tant que colorant basique elle peut colorer diverses structures. Nous avons pu constater qu'il suffit de traces résiduelles de réactif pour que cet effet devienne gênant et dangereux, non seulement le fond de gélose, mais aussi les protéines sériques ou les précipités immunochimiques fixant en pareil cas le colorant.

(2) Ce fait a été utilisé en chimie analytique pour la détection et le dosage de la formaline en présence d'autres aldéhydes. Dénigès montra qu'en présence d'un Schiff fortement acidifié par le SO_4H_2 la plupart des aldéhydes forment des complexes colorés qui se détruisent tandis que le formaldéhyde résiste. Nous avons essayé, sur des glycoprotéines clivées par l'acide periodique, un réactif préparé suivant ce principe [14]. Aucune réaction n'était décelable après vingt minutes de contact avec le réactif. Etant donné que sa teneur en SO_2 libre était de 2,8 mMol. p. 100, seule l'acidité fut responsable de l'échec de la réaction.

Dans l'électrophorèse en gélose, au contraire de l'histochimie, la déshydratation par l'alcool n'est pas nécessaire. Nous préférons prolonger le lavage jusqu'à élimination totale du réactif. Pour cela, nous ajoutons à la solution d'acide sulfureux une certaine proportion de glycérine. Cette « eau sulfureuse glycinée » s'est montrée un très bon stabilisateur. Elle rend moins drastique l'action réductrice de l'acide sulfureux, et prolonge considérablement la stabilité de la coloration.

D. Contrôle de la réaction. — On ne saurait trop insister sur l'importance d'un contrôle rigoureux de la réaction. Des colorations autres que celles dues aux produits d'addition aldéhydes-Schiff peuvent facilement se surajouter et fausser complètement l'interprétation de la réaction.

L'emploi d'agents bloquants des fonctions aldéhydes, intercalés entre le traitement par l'acide periodique et le réactif de Schiff, semble être un bon contrôle. Dans ce but, nous employons, comme Danielli [4], le chlorhydrate d'hydroxylamine. A pH 4,7 et en solution à 10 p. 100, elle bloque en quinze minutes, à la température du laboratoire, les aldéhydes libérés par l'acide periodique à partir des glycoprotéines du sérum. Dans ces conditions, seules subsistent les réactions qui ne sont pas dues aux glucides.

E. Spécificité de la réaction. — L'acide periodique ne réagit pas seulement avec les groupements 1,2-glycols, mais aussi avec les groupements 1-hydroxy-2-amino, 2-alkylamino et avec les α_1 -cétols.

Déjà de nombreuses substances peuvent contenir les groupements 1,2-glycols et donner ainsi une réaction positive acide periodique-Schiff. Pearse [18] signale parmi elles : les polysaccharides, les muco- et glycoprotéines, les glycolipides, les lipides non saturés et les phospholipides. C'est surtout sur ces deux dernières catégories qu'il faut insister.

La présence de phospholipides dans certaines fractions des protéines sériques est incontestable et nous en avons mis en évidence dans les précipités spécifiques antigène-anticorps. Il est donc nécessaire d'écarter la possibilité de leur présence avant d'interpréter une réaction acide periodique-Schiff positive comme due à des glucides.

F. Préparation des réactifs. — *Réactif de Schiff* : Dissoudre 1,5 g de fuchsine basique (3) dans 500 ml d'eau distillée bouillante. Filtrer à 55° C. Au filtrat refroidi à 40° C, ajouter 25 ml de CH_3I 2N et 3,75 g de métabisulfite de sodium ($\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_5$). Agiter pour assurer une dissolution rapide. Compléter à 500 ml avec de

(3) Nous employons de la fuchsine basique Geigy.

l'eau distillée. Laisser à la glacière — dans un flacon bouché — pendant seize heures. Ajouter ensuite 1,25 g de charbon animal. Laisser en contact quarante à soixante secondes. Filtrer rapidement (cette filtration ne doit pas durer plus de deux à trois minutes). Conserver à la glacière (4).

Ce réactif doit contenir 3,5 à 4,5 mMol. de SO_2 libre par 100 ml. Sa teneur en fuchsine est de 300 mg p. 100 et son acidité 0,1 N en ClH.

Acide periodique : Acide periodique à 1 p. 100 dans l'acétate de sodium M/10.

Chlorhydrate d'hydroxylamine : Chlorhydrate d'hydroxylamine (exempt de ClH libre) à 10 p. 100 dans un tampon acétate Na-acétate acétique $\mu = 0,2$, pH = 4,7.

Solution de lavage : Mélanger, juste avant emploi, 50 ml de métabisulfite de Na à 10 p. 100 et 50 ml de ClH₂N, et compléter à 1 l avec de l'eau.

Eau sulfureuse glycinée : Ajouter à la solution d'eau sulfureuse préparée comme ci-dessus, 20 p. 100 de glycérine.

G. Marche de la réaction. — Les plaques, soit d'électrophorèse simple, soit d'immuno-électrophorèse, desséchées à l'étuve sont traitées de la façon suivante :

- | | |
|--|---------|
| 1. — Chlorhydrate d'hydroxylamine | 15 min. |
| 2. — Lavage à l'eau courante | 15 min. |
| 3. — Acide periodique | 10 min. |
| 4. — Lavage à l'eau courante | 10 min. |
| 5. — Réactif de Schiff (dilué de moitié avec de l'eau distillée
immédiatement avant son emploi) | 3 min. |
| 6. — Trois lavages de deux minutes dans la solution d'eau
sulfureuse. | |
| 7. — Trois bains d'une heure chacun dans l'eau sulfureuse
glycinée. | |
| 8. — Séchage à l'étuve. | |

Pour les plaques de contrôle, on commence par les temps 3 et 4, on continue par les temps 1 et 2, pour employer finalement les temps 5, 6, 7 et 8 (V. planche, fig. B).

4° COLORATION DES ACÉTALPHOSPHATIDES. — Feulgen et collaborateurs (1928) ont réussi à isoler, à partir des phospholipides, une fraction qu'ils ont appelée « plasmalogène ». Ultérieurement, ils ont pu reconnaître qu'elle était constituée par des acétal phosphatides. De nombreuses recherches histochimiques ont montré que le « plasmalogène » est largement répandu dans les tissus ani-

(4) Parfois, lors de la filtration, le réactif rosit légèrement, mais il se décolore spontanément au bout de quelques minutes, une fois que l'équilibre entre ses constituants se rétablit à nouveau.

maux. Les acétalosphatides s'hydrolysent en donnant un alcool (le glycérophosphate de cholamine) et un aldéhyde (palmital, stéaral, etc.) ; celui-ci peut être détecté par le réactif de Schiff (5). L'hydrolyse se fait lentement en milieu acide, mais elle est catalysée par le mercure.

Nous avons étudié la présence d'acétalosphatides dans les protéines du sérum et du L. C.-R., et dans les précipités spécifiques sérum humain-immunsérum de cheval antisérum humain total, obtenus par immuno-électrophorèse.

La gélose se prête bien à l'adaptation de la réaction « plasmale » de Feulgen. Nous l'effectuons sur les plaques de gélose déjà desséchées. La réaction comporte : un traitement préalable par le chlorhydrate d'hydroxylamine [4, 18], pour bloquer les aldéhydes qui ont pu être libérés pendant la fixation acide des protéines ou par l'oxygène atmosphérique lors de la dessiccation des plaques (l'oxygène atmosphérique peut cliver la liaison éthylénique des acides gras non saturés avec apparition de deux carbonyles actifs). Après un traitement par le sublimé, suivi d'un autre par le réactif de Schiff, les plaques sont lavées comme précédemment dans l'eau sulfureuse.

A. *Réactifs.* — *Chlorhydrate d'hydroxylamine* (voir plus haut).

Chlorure mercurique : Solution saturée dans l'eau.

Réactif de Schiff : Diluer, juste avant son emploi, le réactif (voir ci-dessus) au tiers dans l'eau distillée. Ce réactif contient 0,100 g de fuchsine et 0,5 à 1,5 mMol de SO_2 libre, par 100 ml, et une acidité en ClH de 0,03 N.

Eau sulfureuse : 10 ml de ClH N et 50 ml de métabisulfite de Na à 10 p. 100 dans 1 l d'eau.

Eau sulfureuse glycinée : La solution précédente additionnée de 20 p. 100 de glycérine.

B. *Marche de la réaction.* — Utiliser les bains suivants :

- | | |
|--|---------|
| 1. — Chlorhydrate d'hydroxylamine | 30 min. |
| 2. — Lavage à l'eau courante | 15 min. |
| 3. — Solution saturée de Cl_2Hg | 10 min. |
| 4. — Lavage à l'eau courante | 2 min. |
| 5. — Réactif de Schiff (dilué) | 2 min. |
| 6. — Trois lavages de deux minutes dans l'eau sulfureuse. | |
| 7. — Trois bains d'une heure dans l'eau sulfureuse glycinée. | |
| 8. — Séchage à l'étuve à 37° C. | |

(5) Le point de départ de ces recherches de Feulgen et coll. a été l'observation de réactions Schiff positives données par certains éléments cellulaires après un contact prolongé avec le réactif de Schiff en l'absence de tout autre traitement préalable. Ils ont nommé « plasmal » la substance responsable de la réaction. De même ils ont constaté que le Cl_2Hg accélérât la vitesse de cette réaction.

Pour les plaques de contrôle, on commence par le 3, suivi du 4, ensuite le 1 (soixante minutes au lieu de trente minutes) et le 2. Finalement les 5, 6, 7 et 8.

C. *Remarques sur la réaction.* — Nous avons étudié le comportement des acétalphosphatides clivés par le Cl_2Hg envers des réactifs de Schiff de différentes sensibilités. Il en ressort, là encore, l'importance de l'acidité et de la teneur en SO_2 libre du réactif pour la marche de la réaction. Avec une acidité supérieure à 0,15 N en ClH , ou une teneur en SO_2 libre au-dessus de 5 mMol. par 100 ml de réactif, la réaction n'a pas lieu. Les valeurs optimales dans nos conditions de travail se situent entre 0,02-0,1 N d'acidité en ClH . et 0,5-1,5 mMol. de SO_2 libre p. 100.

Deux types de complexes colorés Hg-Schiff positif se décèlent avec les protéines sériques séparées par électrophorèse en gélose. Les uns, *instables*, se forment presque instantanément et disparaissent au bout de quelques minutes (cinq à dix minutes) au contact du réactif de Schiff, ou plus lentement (quinze à trente minutes) dans les bains d'eau sulfureuse. Leur teinte, initialement rouge-violette, vire au rouge et finalement au jaune pâle. Les autres, complexes *stables*, se forment plus lentement (deux à trois minutes) et leur intensité augmente légèrement pendant le lavage. Ils présentent la teinte typique des complexes Schiff-aldéhydes, teinte stable après lavage et séchage des plaques.

Nous trouvons les premiers, toujours dans la fraction sérum-albumine et parfois dans les β -globulines. Les complexes stables se décèlent au nombre de un ou deux dans les α_2 -globulines. (V. planche, fig. C).

Les zones sublimé-Schiff positives se superposent à des fractions qui se colorent par le Soudan noir [8, 23], ce qui milite en faveur de leur caractère lipidique.

Toutes les lignes des précipités spécifiques sérum humain-immunsérum de cheval antisérum humain total donnent des complexes colorés de type instable avec le réactif de Schiff, à la suite d'un traitement préalable par le sublimé. Dans ce cas, il est logique de penser que les acétalphosphatides proviennent de l'antisérum spécifique et qu'ils sont entraînés lors de la réaction antigène-anticorps.

Les différences entre les complexes stables et instables, de même que le mécanisme du virage de couleur de ces derniers, restent encore obscurs. Les complexes jaunes et rouges formés par le réactif de Schiff avec certains aldéhydes ont été interprétés [19 b] comme dus à une saturation des trois fonctions amines du réactif (normalement, deux seulement de ces amines se condensent avec deux radicaux carbonyles). Si l'on accepte ce

point de vue, il reste à déterminer si c'est l'excès de SO_2 libre du réactif ou de l'eau de lavage qui accomplit la condensation (ce qui semble peu probable), ou s'il y a intervention de certains groupements libres des molécules protéiques.

Les limites exactes de la réaction « plasmale » et du rôle catalytique du mercure n'ont pas encore été bien établies dans les recherches histochimiques. Selon Lison [15], doivent être considérées comme « plasmales » les seules réactions obtenues sur les corps gras avec le réactif de Schiff après un traitement au moyen du sublimé ou des chlorures de platine, d'iridium ou d'or.

Cette opinion, quoique arbitraire, est une tentative en vue d'établir un critère d'interprétation, étant donné les grandes divergences qui ressortent de nombreux travaux sur la réaction « plasmale ». Mais il serait intéressant d'envisager de plus près certains aspects, et spécialement de préciser le mécanisme de l'effet catalytique du mercure, ainsi que d'autres cations métalliques, qui semblent avoir une action analogue.

IV. — CONCLUSIONS.

Les techniques décrites permettent la caractérisation, par des réactions colorées, des protéines, lipides, phospholipides et glucides dispersés dans le gel après l'électrophorèse simple en gélose ou après l'analyse immuno-électrophorétique. On obtient de minces feuilles transparentes de gélose séchée sur lesquelles les taches ou les bandes colorées sont facilement visibles. On peut alors soit effectuer des mesures photométriques, soit faire des photographies. Ces feuillets de gélose se conservent très longtemps.

Grâce à ces procédés, on obtient, dans l'électrophorèse simple, une double caractérisation des constituants d'un mélange : migration électrophorétique et nature chimique, et parfois même une triple caractérisation dans l'analyse immuno-électrophorétique : migration électrophorétique, spécificité immuno-chimique et nature chimique. Cependant, les précipités spécifiques contenant plus d'anticorps que l'antigène, la mise en évidence de la nature de ce dernier par des réactions colorées est plus difficile.

L'un de nous (J. U.) remercie M. le professeur Bugnard, directeur de l'Institut national d'Hygiène, d'avoir bien voulu subventionner ce travail.

Nous remercions également M. le Dr P. Burtin pour son aide dans la rédaction de ce texte, et M^{lles} J. Courcon et G. Christol pour leur collaboration technique.

SUMMARY.

Techniques are described which allow the characterization of proteins, lipids, phospholipids and glycoproteins after their dispersion by electrophoresis in agar-gels or after immuno-electrophoresis. Thin transparent films of dried agar are obtained in which the spots or the lines of specific precipitates are clearly visible and can be either measured by direct photometry or photographed.

These methods allow double (electrophoretic mobility and chemical nature) or triple (electrophoretic mobility, immunochemical specificity and chemical nature) characterizations.

BIBLIOGRAPHIE

- [1] W. B. ATKINSON. *Stain Technology*, 1952, **27**, 153-160.
- [2] B. BJÖRKLUND. *Proc. Soc. exp. Biol. Med.*, 1954, **85**, 438.
- [3] L. C. COLEMAN. *Stain Technology*, 1938, **13**, 123-124.
- [4] J. F. DANIELLI. *Quart. J. micr. Sci.*, 1950, **91**, 215.
- [5] E. L. DURRUM. *Abstract Papers 115th Meeting Am. chem. Soc.*, 1949 ; *J. Am. Chem. Soc.*, 1950, **72**, 2943.
- [6] E. L. DURRUM, M. H. PAUL et E. R. B. SMITH. *Science*, 1952, **116**, 428-430.
- [7] P. FINHOLT et T. ASMUND. *Chem. Abst.*, 1945, **39**, 3750.
- [8] K. GAVRILESCO, J. COURCON, P. HILLION, J. URIEL, J. LEWIN et P. GRABAR. *Bull. Soc. Chim. biol.*, 1955, **37**, 803-807.
- [9] P. GRABAR et C. A. WILLIAMS. *Bioch. Bioph. Acta*, 1953, **10**, 193-194 ; 1955, **17**, 67.
- [10] A. H. GORDON, B. KEIL, K. SEBESTA, O. KNESSL et F. SORM. *Coll. Trav. Chim. Tchecosl.*, 1950, **15**, 1.
- [11] W. GRASSMANN. *Naturwiss.*, 1951, **38**, 200.
- [12] R. D. A. HOTCHKISS. *Arch. Biochem.*, 1948, **16**, 131.
- [13] E. KOIW et A. GRONWALL. *Scand. J. Clin. Lab. Invest.*, 1952, **4**, 244.
- [14] D. E. KRAMM et C. L. KOLB. *Anal. Chem.*, 1955, **27**, 1076.
- [15] L. LISON. *Histochimie et Cytochimie animales*, Gauthier-Villars, éd., Paris, 1953.
- [16] J. B. LONGLEY. *Stain Technology*, 1952, **27**, 161.
- [17] J. F. A. MC MANNUS. *Nature*, 1946, **158**, 202.
- [18] A. G. E. PEARSE. *Histochemistry*. Churchill Ltd, éd., Londres, 1953.
- [19] P. RUMPF. *Ann. de Chim.*, 1935, **3**, 327-442.
- [19 bis] J. B. SHOESMITH, C. E. SOSSON et A. C. HETHERINGTON. *J. chem. Soc.*, 1927, **130**, 2221.
- [20] B. SWAHN. *Scand. J. Clin. Lab. Invest.*, 1952, **4**, 98-103.
- [21] F. TURBA et H. J. ENENKEL. *Naturwiss.*, 1950, **37**, 93.
- [22] J. URIEL et J. J. SCHEIDEGGER. *Bull. Soc. Chim. Biol.*, 1955, **37**, 165-168.
- [23] J. URIEL et P. GRABAR. *Bull. Soc. Chim. biol. (à parattre)*.
- [24] H. WIELAND et G. SCHEUING. *Ber. Dtsch. chem. Gesellsch.*, 1920, **54 B**, 2527.

LÉGENDE DE LA PLANCHE

Etudes sur le sérum humain normal. A, B, C, D : électrophorèse simple en gélose. E, F : analyse immunoélectrophorétique.

A. — Coloration des protéines par l'amidoschwarz.

B. — Coloration de glucoprotéines (ac. periodique-Schiff).

C. — Coloration des acétalphosphatides (mercure-Schiff).

D. — Coloration des lipides par le Soudan Noir.

E. — Coloration des précipités spécifiques par l'azocarmin (le diagramme du haut a été obtenu avec un immunosérum de cheval, celui du bas avec le même immunosérum épuisé par les γ -globulines).

F. — Coloration des lipoprotéines des précipités spécifiques.

A

B

C

D

E

F



ÉTUDE IMMUNOCHIMIQUE SUR LES SALMONELLES

I. — POLYOSIDES EXTRAITS DE *S. TYPHI*, *S. PARA TYPHI* B ET *S. TYPHI MURIUM*

par A.-M. STAUB et G. PON (*).

(Institut Pasteur. Service des Vaccins)

On sait que pour éliminer la totalité des agglutinines d'un sérum anti-*S. typhi* ou anti-*S. gallinarum*, il faut précipiter ces sérums par l'antigène somatique, grosse molécule complexe glucido-protéido-lipidique (Staub [10], Davarpanah [1]), ou peut-être glucido-lipidique (Landy [6]). Après l'élimination des anticorps homologues des polyosides, extraits de ces complexes par hydrolyse acide, subsistent encore des anticorps susceptibles d'agglutiner les corps microbiens (Staub, Landy). Par conséquent ces polyosides ne constituent qu'une partie des agglutinogènes, et donc des antigènes dénombrés dans le tableau de White-Kauffman. Néanmoins, la connaissance de leur constitution aidera déjà à connaître celle des agglutinogènes.

Dans ce but, nous avons analysé trois polyosides extraits par hydrolyse acétique de trois salmonelles : deux de ces salmonelles, *S. typhi murium* et *S. paratyphi* B, appartiennent au même groupe B, la troisième, *S. typhi*, au groupe D.

Nous avons donné dans deux autres mémoires les résultats de l'analyse chimique [9]. Nous donnerons ici ceux de l'analyse immunochimique effectuée au moyen des méthodes de précipitation quantitative de Heidelberger et Kendall et de précipitation en gel de Oudin.

MATÉRIEL ET TECHNIQUES.

Souches : Les souches microbiennes (*S. typhi* O 901 et T 50-5, *S. paratyphi* B et *S. typhi murium*) sont les mêmes que celles mentionnées dans nos autres mémoires [9].

Polyosides : Nous avons utilisé trois polyosides extraits par hydrolyse acétique N/10 des germes desséchés à l'acétone des trois salmonelles : *S. typhi* (polyoside T), *S. paratyphi* B (polyoside B) et *S. typhi murium* (polyoside T. M.). Les détails de la préparation de ces polyosides ont été donnés avec l'étude mentionnée plus haut.

(*) Manuscrit reçu le 5 décembre 1955.

Sérums : Nous avons utilisé quatre immunsérums anti-microbiens et un sérum anti-antigène somatique :

Un sérum de lapin anti-*S. typhi* anti-microbien,

Un sérum de lapin anti-*S. paratyphi* B anti-microbien,

Un sérum de cheval anti-*S. typhi* anti-microbien,

Un sérum de cheval anti-*S. paratyphi* B anti-microbien.

Tous les animaux ont été immunisés au moyen de germes tués par chauffage à 100° pendant une heure, comme nous l'avons indiqué dans une étude antérieure [41]. Les chevaux ont reçu 8 injections intraveineuses contenant des quantités de germes régulièrement croissantes allant de 4 à 420 milliards.

Les lapins ont reçu par voie intraveineuse, deux fois par semaine, 1, 2 puis 4 milliards des mêmes germes (1 injection de 1 milliard, 1 injection de 2 milliards, puis 4 injections de 4 milliards).

Un sérum de lapin anti-antigène somatique typhique a été préparé suivant la technique antérieurement décrite [41]. Les animaux ont reçu en tout 20 injections.

Les techniques de précipitation en milieu gélifié furent celles de Oudin [7] (diffusion simple en tube) et de Ouchterlony [8] (diffusion double en boîte). Les courbes de précipitation spécifique de Heidelberg ont été établies en suivant les détails de technique indiqués par Grabar dans les *Techniques de laboratoire* de Loiseleur [3].

RÉSULTATS EXPÉRIMENTAUX.

A. PRÉCIPITATION EN MILIEU GÉLIFIÉ (1). — Les images données par les tubes de Oudin (fig. 1) sont peu nettes, car nos préparations sont des polyosides et l'on sait que ces produits ne donnent pas, avec cette technique, les lignes nettes des protéines [7]. On peut distinguer néanmoins deux zones distinctes pour la réaction sérum anti-*S. paratyphi* B-polyoside B (fig. 1 *a*) et une seule zone pour la réaction sérum anti-*S. typhi*-polyoside T (fig. 1 *d*). Les réactions croisées ne donnent rien de lisible (fig. 1 *c* et 1 *b*).

Les images des boîtes d'Ouchterlony ont été obtenues avec les globulines des sérums, concentrées trois fois, afin de voir les réactions croisées. Nous n'avons toujours pas observé dans ces conditions de réaction croisée entre le sérum anti-*S. paratyphi* B et le polyoside T ; mais les figures 2 *a* et 2 *c* montrent les réactions croisées entre le sérum anti-*S. typhi* et les polyosides B et T. M. : on distingue deux lignes avec le polyoside B, dont l'une rejoint celle donnée par le polyoside T. M. La réaction homologue polyoside T-sérum anti-*S. typhi* ne donne qu'une ligne (fig. 2 *a*) comme avec les tubes de Oudin. Par contre, la réaction

(1) Les précipitations en gel par diffusion simple ont été effectuées par M^{lle} Michel dans le laboratoire de M. Oudin et sous sa direction. Les précipitations en gel par diffusion double ont été effectuées par M^{me} Kaminski, dans le service de M. Grabar. Nous les remercions vivement pour leur précieux concours.

polyoside B-sérum anti-*S. paratyphi* B ne donne plus qu'une ligne (qui rejoint celle donnée par le polyoside T. M.) [fig. 2 b]. On ne retrouve pas les deux zones, visibles dans les tubes de Oudin.

Enfin, une dernière variante de la technique de double diffusion, mise au point par M^{me} Kaminski [5], confirme les résultats des boîtes d'Ouchterlony (fig. 3). On retrouve la ligne unique du polyoside T avec le sérum T qui coupe les deux lignes données

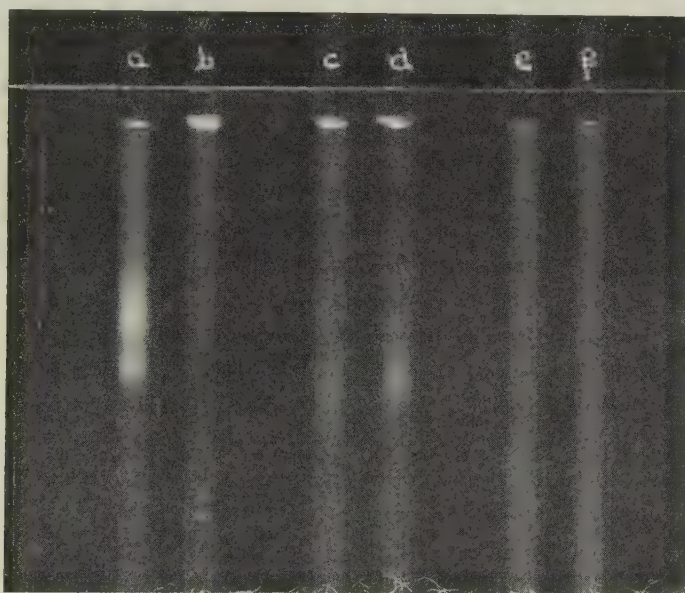
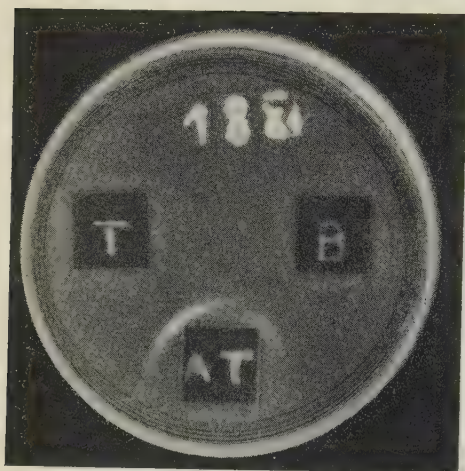


FIG. 1. — Tubes de Oudin (diffusion simple).

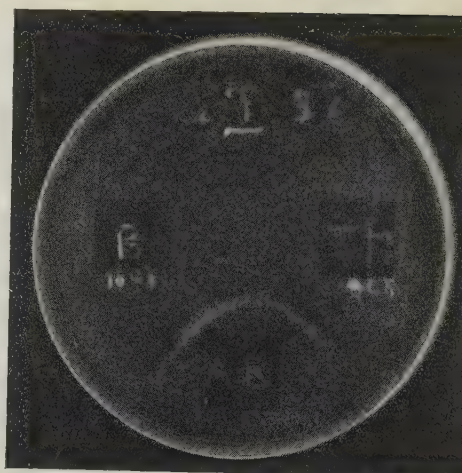
- a) : sérum anti-*S. paratyphi* B et polyoside B, on voit deux zones de précipitation ;
 b) : sérum anti-*S. paratyphi* B et polyoside T ; c) : sérum anti-*S. typhi* et polyoside B ; d) : sérum anti-*S. typhi* et polyoside T, on voit une zone de précipitation ;
 e) et f) : témoins avec du sérum normal, les réactions croisées ne donnent pas de réaction visible.

par le polyoside B avec ce même sérum, dont l'une rejoint la ligne de précipité donnée par le polyoside T. M. On retrouve avec le sérum anti-*S. paratyphi* B la ligne unique donnée par les polyosides B et T. M.

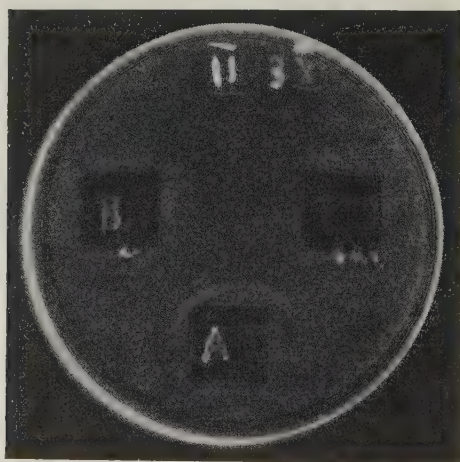
De toutes ces images on peut donc conclure que le polyoside T semble homogène, alors que le polyoside B contient au moins deux constituants dont l'un se retrouve dans le polyoside T. M., puisque les lignes de leurs précipités se rejoignent [8]. Les motifs antigéniques de ces deux constituants semblent d'ailleurs se



a



b



c

FIG. 2. — Boîtes de Ouchterlony (diffusion double).

A T : globulines concentrées du sérum de cheval anti-*S. typhi* ; A B : globulines concentrées du sérum de cheval anti-*S. paratyphi* B ; T : polyoside T (extrait de *S. typhi*) ; B : polyoside B (extrait de *S. paratyphi* B) ; T M : polyoside T M (extrait de *S. typhi murium*) ; a) : réaction croisée entre le polyoside T et le polyoside B (les lignes se coupent) ; b) : les polyosides B et T M contiennent un constituant immunologiquement identique (les deux lignes se rejoignent) ; c) : comme b), mais on distingue en outre un deuxième constituant dans de polyoside B.

retrouver dans le constituant unique du polyoside T avec d'autres motifs propres à ce polyoside (sur les fig. 2 a et 3, les lignes de B aboutissent en effet à la ligne T sans la couper, alors que



FIG. 3. — Plaque de diffusion double (M. Kaminski).

Cf. légendes de la figure 2. Confirmation des résultats de la figure 2 : 1° présence de deux constituants dans le polyoside B dont l'un est identique au constituant identifié dans le polyoside TM (les deux lignes de précipité se réunissent pour former un feston) ; 2° réaction croisée entre ces constituants et le polyoside T (la ligne de précipité observée avec le polyoside T et le sérum AT coupe les deux lignes données par le polyoside B). Pas de réaction croisée entre T et le sérum AB.

celle-ci coupe les deux lignes B, ce qui est le propre des réactions croisées [8 et 5]).

B. PRÉCIPITATION QUANTITATIVE. — a) *Sérums anti-S. typhi*. — Nous n'avons indiqué sur le tableau I que les résultats obtenus avec le polyoside T extrait de la souche O 901, le polyoside extrait de la souche T₅₀₋₅ donnant des résultats identiques.

TABLEAU I. — Courbes de précipitation des sérums anti-S. typhi.

A) Sérum de cheval (0,5 cm ³)									
p.p. de polyoside	Polyoside T			Polyoside B			Polyoside T.M.		
	mg. d'azote précipités	surnageant S	A	mg. d'azote précipités	surnageant S	A	mg. d'azote précipités	surnageant S	A
2,5	/	/	/	/	/	/	30	-	+
5	50	-	+	39	-	+	46	-	+
7,5	/	/	/	/	/	/	48	+	+
10	103	-	+	60	-	+	50	+	+
15	152	-	+	/	+	+	/	/	/
20	203	-	+	76			51	+	+
25	222	-	+	/	/	/	/	/	/
30	240	-	+	80	+	+	68	+	+
35	253	-	-	/	/	/	/	/	/
40	256	+	-	90	+	+	66	+	+
50				89	/	-	/	/	/
60				89	+	-	68	+	+
70				100	+	-			
80				99	+	-			
90				103	+	-			
100				103	+	-			
110				106	+	-			
B) Sérum de lapin antimicrobien (1 cm ³)									
10	53	-	-	0	-	+			
20	76	-	-	5	-	+			
30	92	+	-	11	-	+			
40	97	+	-	12	-	-			
60	/	+	-	16	+	-			
C) Sérum de lapin anti-antigène somatique (1 cm ³)									
10	51	-	+	5	-	+			
20	99	-	+	11	-	+			
30	144	+	-	/	/	/			
40	161	+	-	21	-	+			
50	160	+	-	/	/	/			
60	/	/	/	28	+	±			
80	/	/	/	38	+	-			
100	/	/	/	47	+	-			
120	/	/	/	42	+	-			

Les polyosides B et T. M. précipitent le *sérum anti-S. typhi de cheval* (fig. 4, courbes B et T. M.) ; 40 p. 100 des anticorps précipitables par le polyoside T sont précipitables par le polyoside B, ce qui démontre la présence de motifs antigéniques

propres à *S. typhi* sur le polyoside T. La large zone d'équivalence (20 à 40 µg) traduit la complexité du polyoside B, révélée par l'étude des précipitations en gel. Le polyoside T. M. ne précipite que 27 p. 100 des anticorps précipitables par le polyo-

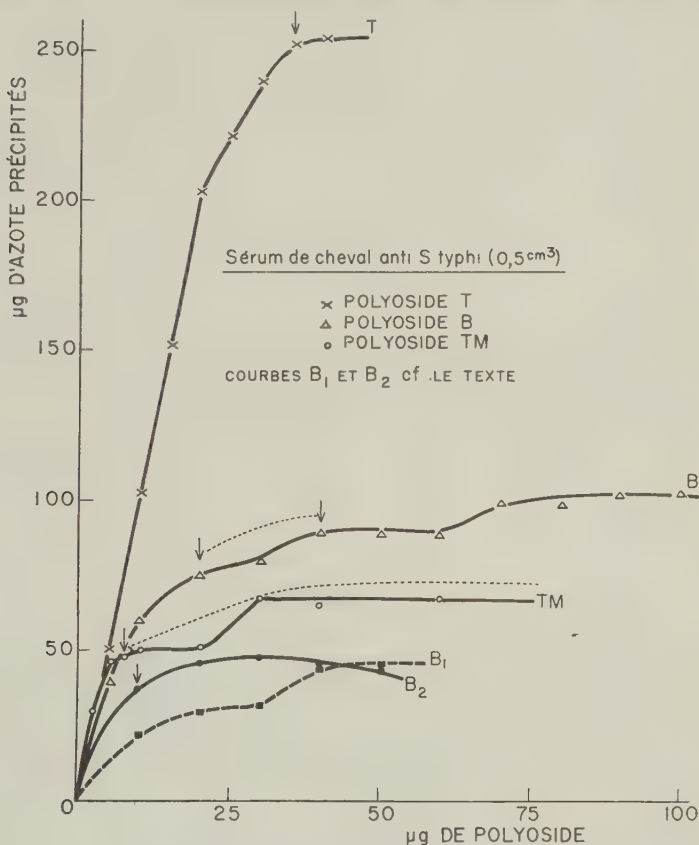


FIG. 4. — Courbes de précipitation du sérum de cheval anti-*S. typhi* par les trois polyosides :

ψ point d'équivalence ; ψ.....ψ zone d'équivalence ;
ψ..... on n'a pas pu obtenir de tube sans excès d'anticorps.

side T. Il faut remarquer toutefois que, dans ce cas, nous n'avons jamais précipité tous les anticorps précipitables par T. M. : bien que la courbe ait atteint un plateau, l'étude des surnageants montre une large zone de chevauchement où antigène et anticorps sont tous deux en excès, ce qui traduit la complexité de nos préparations de polyoside T. M. Un des constituants du

polyoside T. M. doit être présent en trop faible quantité pour être capable de précipiter tous les anticorps correspondants, du moins avec les quantités que nous avons employées. Cette pauvreté du polyoside T. M. en ce constituant expliquerait l'absence de la deuxième ligne (visible avec le polyoside B) dans les réactions sérum anti-*S. typhi*-polyoside T. M. en milieu gélifié. Par contre la zone étroite d'équivalence observée avec le polyoside T serait en faveur de l'homogénéité de ce polyoside.

Les polyosides B et T. M. précipitent aussi nos deux sérums

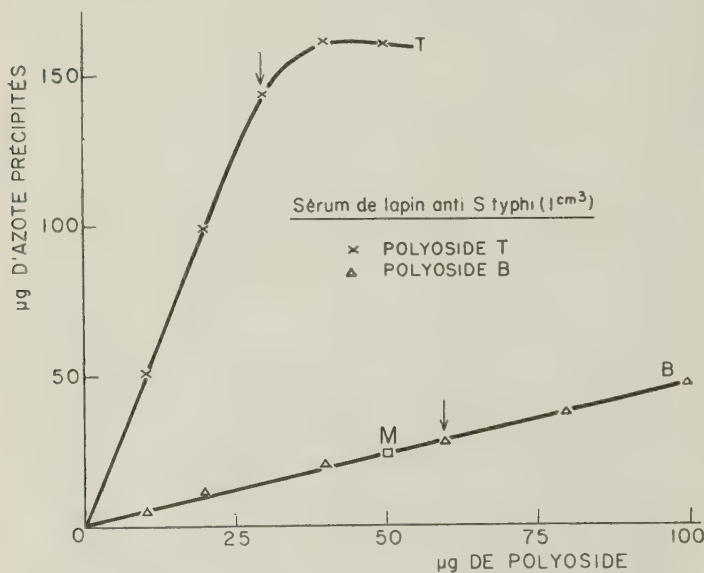


FIG. 5. — Courbes de précipitation du sérum de lapin anti-*S. typhi* par les polyosides T et B.

de lapin anti-*S. typhi*, mais la précipitation avec le polyoside T. M. est si faible que nous n'avons pas pu en faire une étude quantitative. La précipitation croisée par le polyoside B est beaucoup plus faible qu'avec le sérum de cheval [25 p. 100 environ] (fig. 5, courbe B ; tableau I C).

Nous nous sommes demandé si, parmi les constituants de notre polyoside B, certains précipitaient le sérum de cheval et non le sérum de lapin. Nous avons donc procédé à l'expérience suivante :

On précipite 300 microg. de polyoside B, contenus dans 6 cm³ de solution physiologique, par 6 cm³ de sérum de lapin anti-*S. typhi* ; ces proportions correspondent au point M de la courbe B (fig. 5) et

nous placent dans un large excès d'anticorps ; après élimination du précipité, le surnageant ne précipite plus avec le sérum de lapin anti-*S. typhi*, qui s'y trouve déjà en excès, mais il précipite avec le sérum anti-*S. typhi* de cheval (tableau V, p. 453, exp. 4).

Il y a donc dans notre polyoside B deux fractions distinctes : l'une B_I, qui précipite le sérum anti-*S. typhi* de lapin, l'autre B_{II} qui n'est pas précipitée par ce sérum de lapin mais qui est précipitée par le sérum anti-*S. typhi* de cheval.

L'étude quantitative de la précipitation du sérum de cheval par la fraction B_{II} (polyoside B précipité par un excès de sérum de lapin) nous a donné les résultats consignés dans le tableau II et

TABLEAU II. — Précipitation du sérum anti-*S. typhi* de cheval par le polyoside B et ses fractions.

microg. de polyoside ajoutés à 0,5 cm ³ de sérum	Polyoside B total (B _I +B _{II}) A		Fraction B _{II} B surnageant de la précipitation du polyoside B par le sérum de lapin anti- <i>S. typhi</i>		Fraction B _I chiffres calculés par différence A - B
	microg. d'azote précipités	surnageant S A	microg. d'azote précipités	surnageant S A	microg. d'azote précipités
10 ou 0,4 cm ³ ^M	60	- +	38	- -	22
20 ou 0,8 cm ³	76	+ +	46	+ -	30
30 ou 1,2 cm ³	80	+ +	49	+ -	32
40 ou 1,6 cm ³	90	+ +	46	+ -	44
50 ou 2 cm ³	89	+ -	44	+ -	45

la figure 4 (courbe B₂). Nous avons calculé par différence la courbe de précipitation donnée par la fraction B_I (fig. 4, courbe B₁). On voit que la fraction B_{II} donne une courbe de précipitation qui atteint rapidement son maximum, alors que la fraction B_I, qui est précipitée par le sérum anti-*S. typhi* de lapin, donne avec le sérum de cheval une courbe de précipitation (B₁) à faible pente, qui n'atteint son maximum que pour 40 µg de polyoside. Cette faible pente indique, soit que le polyoside contient peu de B_I, soit que la fraction B_I contient peu de motifs antigéniques communs à *S. typhi* et *S. paratyphi* B.

b) Sérums anti-*S. paratyphi* B.

Les trois polyosides précipitent les sérums anti-*S. paratyphi* B de cheval et de lapin (tableau III).

Le polyoside T. M. précipite 94 p. 100 des anticorps du sérum de cheval, précipitables par le polyoside B. Après précipitation par le polyoside T. M., il reste encore des anticorps précipitables par le polyoside B (tableau IV).

Les deux courbes T. M. et B (fig. 6 et 7) ont d'ailleurs des formes tous à fait différentes, qui doivent traduire des proportions différentes des constituants des polyosides puisque nous savons

TABLEAU III. — Courbes de précipitation des sérums anti-*S. paratyphi* B avec les différents polysides.

A) Sérum de cheval (0,5 cm3)									
microg. de poly- side	Polyoside T			Polyoside B			Polyoside T.M.		
	microg.d'azote précipités	surnageant		microg.d'azote précipités	surnageant		microg.d'azote précipités	surnageant	
		S	A		S	A		S	A
2,5	17	-	+	32	/	/	/	/	/
5	19	-	-	58	-	+	92	-	+
7,5	20	+	-	82	/	/	/	/	/
10	18	+	-	105	-	+	142	-	+
12,5	18	+	-	-	/	/	/	/	/
15	/	/	/	110	-	+	/	/	/
20	/	/	/	125	-	+	169	+	-
30	/	/	/	180	-	-	169	+	-
40	/	/	/	178	+	-	162	+	-
B) Sérum de lapin (1 cm3)									
		S	A		S	A		S	A
5	20	-	-	/	-	+	/	-	+
10	28	-	-	63	-	+	105	-	+
15	29	+	-	/	-	+	/	-	+
20	26	+	-	81	-	+	140	-	+
30	25	+	-	115	+	+	160	+	-
40	20	+	-	134	+	+	163	+	-
60				144	+	-	142	+	-
80				146	+	-	130	+	-

TABLEAU IV. — Etude des réactions croisées des sérums anti-*S. paratyphi* B par les polysides B et T. M.

Sérum de	précipité par	Surnageant éprouvé par	
		Polyoside B	Polyoside TM
Cheval	polyoside B	-	-
	polyoside T.M.	+	-
Lapin	polyoside B	-	-
	polyoside T.M.	+	-

que ces polysides sont hétérogènes. Cette hétérogénéité explique les résultats, *a priori* paradoxaux, obtenus avec le sérum de lapin anti-*S. paratyphi* B (tableau III B) : le polyside T. M. (hétérologue) précipite plus d'anticorps que le polyside B (homologue) bien que ce dernier polyside soit capable de précipiter un sérum épuisé par le polyside T. M. sans que le contraire soit possible (tableau IV). Ceci rappelle les résultats obtenus par M. Kaminski et O. Ouchterlony [4] avec l'ovalbumine et le blanc d'œuf et ne peut s'expliquer, comme l'ont fait ces auteurs, que

si l'on admet que les constituants du polyoside B sont dans des proportions telles que certains constituants, déjà en grand excès, forment des complexes insolubles, alors que d'autres n'ont pas encore précipité tous les anticorps correspondants.

Le polyoside T ne précipite qu'une très petite fraction des

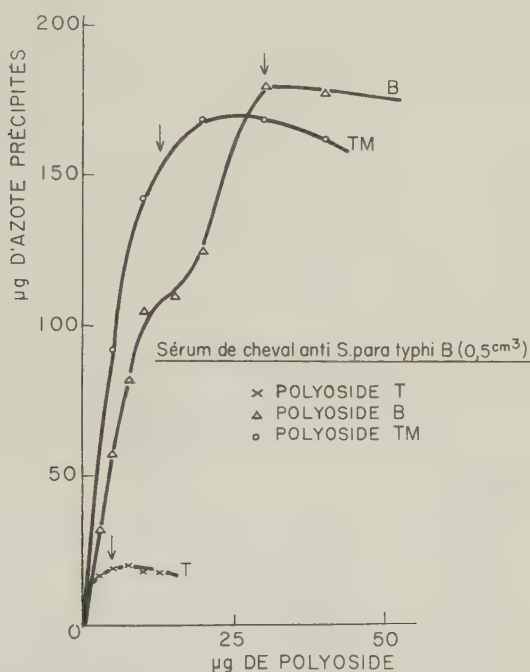


FIG. 6. — Courbes de précipitation du sérum de cheval anti-*S. paratyphi* B par les trois polyosides.

anticorps contenus dans ces sérums anti-*S. paratyphi* B (10 à 14 p. 100).

c) *Analyse des trois polyosides.* — L'expérience relatée ci-dessus (p. 448) nous a montré qu'il était possible de séparer le polyoside B en deux fractions en le précipitant par le sérum de lapin anti-*S. typhi*, puis par le sérum de cheval anti-*S. typhi*. Nous nous sommes demandé s'il ne serait pas possible d'analyser ainsi nos trois polyosides, grâce au jeu des précipitations par les quatre sortes de sérums dont nous disposons : sérums anti-*S. typhi* de cheval et de lapin, sérums anti-*S. paratyphi* B de cheval et de lapin.

Nous avons donc précipité chacune des solutions des polyosides avec un excès des sérums hétérologues : polyosides B et T. M. par les sérums anti-*S. typhi*, polyoside T par les sérums anti-*S. paratyphi* B. Puis nous avons recherché quels sérums précipitaient avec le surnageant de cette précipitation, en utilisant l'épreuve du disque (« ring-test »). Le tableau V relate les résultats de ces épreuves.

On voit que :

1° Le polyoside T est totalement précipité par le sérum de

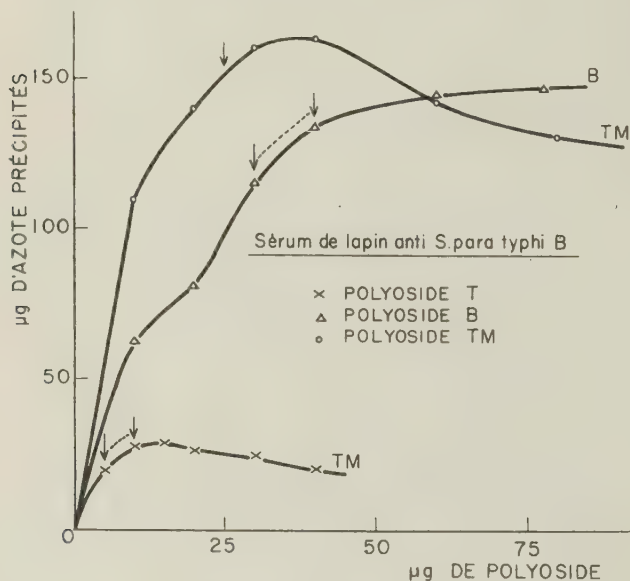


FIG. 7. — Courbes de précipitation du sérum de lapin anti-*S. paratyphi* B par les trois polyosides.

cheval anti-*S. paratyphi* B (exp. n° 1) : il ne reste donc pas en solution de fractions contenant les motifs antigéniques propres à *S. typhi*. Il semblerait donc que les motifs propres à *S. typhi*, mis en évidence par l'observation de la p. 446, et les motifs communs avec *S. paratyphi* B soient portés par une même molécule.

Par contre, la précipitation du même polyoside par le sérum de lapin anti-*S. paratyphi* B (exp. n° 2) laisse en solution une fraction qui précipite les deux sérums de cheval (anti-T et anti-B). Il existe donc deux fractions dans le polyoside T : l'une, T₁ qui précipite aussi bien par les sérums de cheval que par les sérums

TABEAU V. — Analyse des 3 polyosides au moyen des 2 sérums anti-*S. typhi* et des 2 sérums anti-*S. paratyphi* B.

Expérience n°	Polyoside	Sérum précipitant (1)	Sérums ajoutés au surnageant			
			sérum de cheval		sérum de lapin	
			Sérum anti T (2)	anti B (3)	anti T (2)	anti B (3)
1	T	cheval anti B (3)	-	-(4)	-	-
2	T	lapin anti B	+	+	-	-(4)
3	B	cheval anti T (2)	-(4)	+	-	-
4	B	lapin anti T	+	+	-(4)	+
5	T.M.	cheval anti T	-(4)	+	-	-
6	T.M.	lapin anti T	+	+	-(4)	+

(1) Précipitation du polyoside par un excès du sérum, traduit par le fait que le surnageant précipite avec le polyoside. — (2) Anti-*S. typhi*. — (3) Anti-*S. paratyphi* B. — (4) Sérum ayant servi à précipiter le polyoside.

de lapin (résultats de l'exp. n° 1) : elle contient des motifs antigéniques propres à *S. typhi* (T_I) et d'autres qui sont communs avec *S. paratyphi* B (L) [tableau VI] ; l'autre, T_{II} qui ne précipite qu'avec les sérums de cheval : elle contient des motifs antigéniques communs aux deux espèces, différents de L (K) [tableau VI] et peut-être des motifs antigéniques propres à *S. typhi* T₂, auxquels ne correspondraient des anticorps que dans le sérum de cheval anti-*S. typhi* et non dans le sérum de lapin.

2° Les polyosides B et T. M. se comportent de façon identique. Leur précipitation par le sérum de cheval anti-*S. typhi* (exp.

TABEAU VI. — Dénombrement et schématisation des diverses fractions contenues dans les polyosides.

	Fractions	Motifs antigéniques	Précipitation avec			
			Sérums homologues		Sérums hétérologues	
			cheval	lapin	cheval	lapin
Polyoside T	T _I	LT ₁	+	+	+	+
	T _{II}	K ou KT ₂	+	-	+	-
Polyoside B	B _I	LB ₁ ou L	+	+	+	+
	B _{II}	KB ₁	+	-	+	-
	B _{III}	B ₂	+	-	-	-
Polyoside T.M.	TM _I	LB ₁ ou L	+	+	+	+
	TM _{II}	KB ₁	+	-	+	-
	TM _{III}	B ₂	+	-	-	-

K, L : motifs antigéniques communs aux polyosides T et B ou T. M. — T₁ et T₂ : motifs antigéniques propres au polyoside T. — B₁ et B₂ : motifs antigéniques propres aux polyosides B et T. M.

n^{os} 3 et 5) laisse en solution une fraction qui n'est précipitable que par le sérum de cheval anti-*S. paratyphi* B, elle ne doit donc contenir que des motifs antigéniques propres à *S. paratyphi* B (B₂ tableau VI). Nous l'appellerons B_{III}. D'autre part, comme nous l'avons déjà vu (p. 448), la précipitation des polyosides B et T. M. par le sérum de lapin anti-*S. typhi* (exp. n^{os} 4 et 6) laisse en solution une fraction précipitable par le sérum de cheval anti-*S. typhi* (B_{II}) ; contrairement à ce qui se passe avec le polyoside T, cette fraction est aussi précipitable par le sérum de lapin anti-*S. paratyphi* B et doit donc contenir, avec les motifs antigéniques communs à *S. typhi* et *S. paratyphi* B (K), d'autres qui sont propres à B, différents de ceux contenus dans B_{III} (B_I, tableau VI). Quant à la fraction B_I, qui précipite tous les sérums homologues et hétérologues, elle peut ne contenir que des motifs communs à *S. typhi* et à *S. paratyphi* B (L), ou elle peut contenir des motifs propres à *S. typhi* à côté de ces motifs communs (LB_I) [tableau VI].

Pour élucider ce dernier point, on aurait pu tenter de voir si le précipité obtenu avec le sérum anti-*S. typhi* de lapin et le polyoside B (constitué par le complexe L-anti-L ou B_IL-anti-L) absorbait ou non des anticorps d'un sérum anti-*S. paratyphi* B (anticorps anti-B_I). Pour nous assurer de la validité d'une telle recherche, nous avons voulu préalablement vérifier que le précipité T₁L-anti-L, obtenu en précipitant le polyoside T (contenant la fraction T₁ du tableau VI) avec un excès de sérum de cheval anti-*S. paratyphi* B, était capable de fixer les anticorps anti-T₁ du sérum de cheval anti-*S. typhi*.

Les résultats consignés dans le tableau VII montrent que le précipité fixe bien 13 microg. d'azote (68-55) lorsqu'il est conservé quarante-huit heures à 4° en suspension dans le sérum anti-

TABLEAU VII. — Essai de détection des motifs antigéniques libres dans un précipité spécifique.

Sérums de cheval mis en contact avec le précipité	microg. d'azote dosés dans le précipité T ₁ L-anti L ⁽¹⁾
normal (pas d'anticorps)	55
anti <i>S. para</i> B (anticorps L)	80
anti <i>S. typhi</i> (anticorps L et anticorps T ₁)	68

(1) Précipité obtenu en précipitant le polyoside T par un excès de sérum de sérum de cheval anti-*S. paratyphi* B

S. typhi, mais qu'il en fixe plus encore lorsqu'il est en présence du sérum anti-*S. paratyphi* B [80-55 = 25microg.] (2).

Il semble donc que les motifs antigéniques T_1 , bien que liés à aucun anticorps homologue dans le précipité T_1L anti-L, ne soient pas disponibles pour les anticorps anti- T_1 présents dans le sérum anti-*S. typhi*.

Il ne nous était donc pas possible de rechercher par ce moyen la présence d'éventuels motifs antigéniques B_1 dans la fraction B_1 du polyoside B.

DISCUSSION.

1° *Rapports entre les résultats de l'analyse chimique et de l'analyse immunochimique.* — L'analyse chimique des trois polyosides T, B et T. M. extraits de *S. typhi*, *S. paratyphi* B et *S. typhi murium*, nous avait déjà montré [9], que le premier différait profondément des deux autres : l'analyse qualitative des sucres constitutifs montre que le polyoside T contient du tyvélose, les deux autres de l'abéquose, conformément aux résultats d'autres auteurs (Davies [2], Westphal et coll. [12]).

L'analyse quantitative donne pour le polyoside T un bilan complet : 25 p. 100 de glucose, 25 p. 100 de galactose, 25 p. 100 de mannose, 20 p. 100 de rhamnose et 10 p. 100 environ de tyvélose. Par contre, elle ne fournit pour le polyoside B que 56 p. 100 des sucres constitutifs (5 p. 100 de glucose, 20 p. 100 de mannose, 18 p. 100 de galactose et 13 p. 100 de rhamnose). Le reste serait dû à l'abéquose, à des oligosaccharides et peut-être à d'autres substances non encore identifiées.

Les analyses qualitatives et quantitatives des polyosides B et T. M. fournissaient, par contre, des résultats identiques. La seule différence observée entre ces polyosides était l'allure différente de leur courbe d'hydrolyse, le polyoside T. M. étant plus rapidement hydrolysable que le polyoside B.

Ces ressemblances et ces différences, nous les retrouvons avec encore plus d'acuité au cours de cette analyse immunochimique. Les polyosides, T d'une part, B et T. M. d'autre part, diffèrent si profondément que leurs réactions croisées sont très faibles (sauf pour le sérum de cheval anti-*S. typhi*). Quant aux polyosides B et T. M., s'ils sont beaucoup plus voisins, ils ne sont pas identiques puisque le polyoside T. M. ne peut pas précipiter tous les anticorps précipitables par le polyoside B des sérums anti-*S. paratyphi* B. Cette différence se retrouve dans les précipitations des sérums anti-T où le polyoside T. M. précipite toujours moins d'anticorps que le polyoside B.

(2) L'absorption de l'azote par le précipité en présence d'un grand excès de sérum anti-*S. paratyphi* B, doit être due à un remaniement du complexe T_1L -anti-L en présence du grand excès d'anticorps anti-L.

2° *Hétérogénéité des polyosides.* — L'analyse immuno-chimique nous a permis de démontrer l'existence de deux fractions au moins dans le polyoside T, de trois fractions au moins dans les polyosides B et T. M. (tableau VI).

On peut remarquer à cet égard que la seule étude des surnageants ne nous aurait pas indiqué l'hétérogénéité du polyoside T (tableau I A). Elle ne nous aurait pas mieux renseignées dans le cas des polyosides B et T. M. si nous n'avions utilisé que des sérums homologues (tableau III) ; par contre, l'utilisation des sérums hétérologues témoigna de l'hétérogénéité des deux polyosides B et T. M. (tableau I). L'analyse en milieu gélifié ne nous a permis de dénombrer qu'un constituant dans les polyosides T et T. M. et que deux constituants dans le polyoside B.

C'est donc la précipitation des polyosides par divers sérums hétérologues de cheval et de lapin qui s'est révélée la technique la plus fine.

L'hétérogénéité de ces polyosides extraits des germes par hydrolyse acétique n'a rien de surprenant et n'implique absolument pas l'hétérogénéité du complexe antigénique dont ils dérivent, une grosse molécule de polyoside pouvant très bien s'être scindée en plusieurs morceaux au cours de cette hydrolyse. L'existence de fractions telles que T₁, qui contient à la fois des motifs propres à *S. typhi* et des motifs communs à *S. typhi* et à *S. paratyphi* B, témoigne de la complexité de la molécule initiale. Elle prouve, de plus, que les antigènes dénombrés par Kauffmann, qui contiennent les polyosides étudiés, ne sont pas des molécules distinctes, mais doivent représenter différents motifs antigéniques portés par un même antigène. Ceci n'en facilite pas l'étude. Néanmoins, des fractions telles que T_{III} ou B_{III} (tableau VI) qui semblent ne contenir que des motifs communs ou des motifs propres aux deux salmonelles, sont susceptibles de fournir un matériel d'étude plus simple si on arrive un jour à les séparer en assez grande quantité. C'est ce que nous nous proposons de faire.

RÉSUMÉ.

Les polyosides extraits par hydrolyse acétique des germes de *S. typhi*, *S. paratyphi* B et *S. typhi murium* ont été analysés au moyen de trois techniques d'analyse immuno-chimique : précipitation en gel, précipitation quantitative, précipitation fractionnée par des sérums hétérologues. On a pu retrouver ainsi les résultats de l'analyse chimique : proche parenté des polyosides extraits de *S. paratyphi* B et *S. typhi murium*, différence profonde entre ces polyosides et le polyoside extrait de *S. typhi*.

On a pu mettre aussi en évidence deux fractions dans le polyo-

side extrait de *S. typhi* et trois fractions dans ceux extraits des deux autres salmonelles. Certaines de ces fractions ne portent que des motifs antigéniques propres aux germes d'où ils furent extraits, d'autres que des motifs communs à *S. typhi* et *S. paratyphi* B (ou *S. typhi murium*), d'autres un mélange de motifs propres et communs.

SUMMARY.

The polyosides extracted by acetic hydrolysis from *S. typhi*, *S. paratyphi* B and *S. typhi murium*, have been analysed by means of three immunological analytical techniques : gel precipitation, quantitative precipitation, fractionated precipitation by heterologous sera. The results obtained by chemical analysis have been confirmed : close relationship between the polyoside extracts of *S. paratyphi* B and *S. typhi murium*, considerable difference between these polyosides and the polyoside extract of *S. typhi*.

It has also been possible to demonstrate two fractions in the polyoside extract of *S. typhi* and three fractions in the extracts of the two other Salmonellas. Certain of these fractions possess antigenic patterns specific of the organism from which they were extracted, others possess antigenic patterns common to *S. typhi* and *S. paratyphi* B (or *S. typhi murium*), and others a mixture of specific and common antigenic patterns.

BIBLIOGRAPHIE

- [1] C. DAVARPANAH. *Thèse Fac. Sci.*, 1956.
- [2] D. A. L. DAVIES. *Bioch. J.*, 1955, **59**, 696.
- [3] P. GRABAR. In LOISELEUR. *Techniques de laboratoire*, 2^e édition, p. 817.
- [4] M. KAMINSKI et O. OUCHTERLONY. *Bull. Soc. Chim. biol.*, 1951, **33**, 758.
- [5] M. KAMINSKI. *Biochem. Biophys. Acta*, 1954, **13**, 216.
- [6] M. LANDY et coll. *J. Immunol.*, 1955, **74**, 466.
- [7] J. OUDIN. *Ann. Inst. Pasteur*, 1948, **75**, 30 et 109.
- [8] O. OUCHTERLONY. *Act. path. microb. scand.*, 1949, **26**, 507 ; 1953, **32**, 231.
- [9] G. PON et A. M. STAUB. *Bull. Soc. Chim. biol.*, 1952, **34**, 1132 et 1955, **37**, 1283.
- [10] A. M. STAUB. *Ann. Inst. Pasteur*, 1954, **86**, 618.
- [11] A. M. STAUB et R. COMBES. *Ann. Inst. Pasteur*, 1951, **80**, 21.
- [12] O. WESTPHAL, O. LÜDERITZ, J. FROMME et N. JOSEPH. *Angew. Chem.*, 1953, **65**, 555.

ÉTUDE RADIOBIOLOGIQUE DU SYSTÈME LYSOGÈNE D'E. COLI K12.

II. INDUCTION PAR LES RAYONS X. ÉTUDE DES FAIBLES DOSES.

par H. MARCOVICH (*).
avec l'assistance technique de M^{lle} R. VAYNE.

(Institut Pasteur.
Service de Radiologie et Cancérologie)

Un système biologique d'une grande sensibilité aux radiations a été révélé par les travaux de Lwoff et de ses collaborateurs : les bactéries lysogènes.

Une bactérie lysogène possède, inscrite dans sa trame héréditaire, la propriété de produire du bactériophage. Lwoff a donné le nom de prophage à la structure hypothétique qui serait le support de cette propriété [1]. L'induction est le déclenchement des réactions qui sont à l'origine de la formation de phages mûrs à partir du prophage.

Inductibles par les rayons ultraviolets, grâce auxquels le phénomène a été découvert [2], les bactéries lysogènes sont aussi inductibles par les rayons X [3] et par certaines substances chimiques [4].

Dans une culture de ces bactéries en voie de multiplication, il existe des phages libérés par la lyse spontanée d'une certaine fraction de la population.

Quand une suspension de bactéries lysogènes est soumise à un des agents précédents, la lyse survient après une période de latence, et affecte dans un court intervalle de temps toutes les bactéries qui ont été induites. En conséquence, le taux du phage libre augmente dans la culture en proportion du nombre des bactéries induites.

Avec les rayons X, la période latente et le rendement en phages d'une bactérie sont d'une remarquable indépendance à l'égard de la dose [5]. Ceci permet, en mesurant le titre du phage libre après un temps donné quelle que soit la dose, de connaître la fraction des bactéries induites.

Pour les faibles doses, la précision de la mesure de leur activité inductrice est limitée par le taux du phage libre issu des

(*) Société Française de Microbiologie, séance du 3 novembre 1955.

lyses spontanées. Il est difficile d'agir sur la fréquence de ces dernières, mais il est possible par certains artifices de diminuer préférentiellement le taux du phage libre provenant de la lyse spontanée avant l'instant où les bactéries induites par l'irradiation éclatent.

L'utilisation de ce matériel biologique à l'étude de l'action biologique des radiations fait l'objet de ce travail. On envisagera l'influence du facteur temps sur les effets d'une dose donnée (réciprocité), les relations entre la dose reçue et le taux des bactéries induites, l'action de la température, et enfin celle de l'oxygène.

MATÉRIEL ET TECHNIQUE.

SOUCHES BACTÉRIENNES ET MILIEUX DE CULTURE. — La souche lysogène est *Escherichia coli* K 12 (λ) lysogène pour le phage λ , provenant du laboratoire du D^r Lwoff.

La souche sensible à λ est une souche K 12 S, résistante à la streptomycine, aimablement communiquée par le D^r E. Wollman.

Les milieux utilisés sont les mêmes que ceux décrits dans un mémoire précédent [5].

Les bactéries sont utilisées à la fin de la période de croissance exponentielle où leur concentration atteint 2 à $3 \cdot 10^9$ bactéries/cm³.

K 12 (λ), inductible par les rayons U. V., l'est également par les rayons X. Avec ces derniers, la période latente est de cinquante-cinq minutes et le rendement moyen d'une bactérie de l'ordre de 100 à 150 phages. K 12 (λ) est inductible par les rayons γ (radium, ⁶⁰Co).

La taille des bactéries K 12 (λ), en fin de croissance exponentielle, a été déterminée par microscopie électronique dans le service du D^r Bessis. Des mensurations effectuées sur 33 bactéries montrent que leur largeur est très uniforme : 0,66 μ et que leur longueur moyenne est de $1,13 \pm 0,11 \mu$. En les supposant parfaitement cylindriques, et en prenant les valeurs par excès de 0,7 μ de large sur 1,24 μ de long, on leur trouve un volume largement surestimé de 0,42 μ^3 . La valeur de 0,3 μ^3 semble bien plus proche de la réalité.

SOURCES DE RAYONS X ET γ ET CONDITIONS DES EXPÉRIENCES. —

1° *Rayons X*. — La source de rayons X est un tube Holweck démontable, à anticathode de molybdène, fonctionnant sous 37 kv. Le rayonnement filtré par 0,05 mm d'aluminium a une longueur d'onde moyenne de 0,9 Å, ce qui correspond pour les photons à une énergie moyenne de 13 à 15 kv. L'intensité du courant qui alimente le filament peut être réglée entre 40 mA et 1,5 mA, ce qui modifie en proportion le débit du rayonnement.

Les suspensions soumises aux rayons X sont placées dans une cuve en plexiglass à fond rond sous une épaisseur de l'ordre de 1 mm.

La dose est exprimée en roentgens par analogie avec une dose équivalente de rayons γ fournissant la même énergie absorbée.

2° *Rayons γ* . — Pour la relation dose effet, la source de rayons γ est du ⁶⁰Co. La suspension bactérienne, sous un volume de 5 cm³, est

placée dans un tube à essai, la dosimétrie étant effectuée dans les mêmes conditions par le test au sulfate ferreux.

Pour les expériences de réciprocité, on utilise deux aiguilles de 50 mg de radium élément, chacune filtrée par 0,5 mm de platine. Les suspensions de bactéries se trouvent placées dans des cuves en Pyrex. Ells ont une épaisseur de 10 mm. La dosimétrie est contrôlée à l'aide d'une chambre d'ionisation et le résultat concorde à moins de 5 p. 100 avec la dose prévue en appliquant la loi de l'inverse-carré.

3° Sauf indications contraires, les suspensions bactériennes sont irradiées en bouillon et à 0°.

PRINCIPE DES EXPÉRIENCES. — Pour mesurer l'effet inducteur des doses suffisamment grandes de rayons X, l'étalement direct des bactéries induites en présence de la souche indicatrice comporte une précision suffisante.

Pour les très faibles taux d'induction, on peut accroître la précision des mesures par la méthode suivante, plus sensible :

Soit N_r et N_s les nombres de phages libres, N_r dans la suspension bactérienne irradiée une fois que les bactéries induites ont éclaté et N_s dans la suspension témoin non irradiée. Le nombre des phages résultants de l'induction est $N_i = N_r - N_s$. Si la dose inductrice est très faible, N_i est petit et par conséquent N_r est très voisin de N_s .

La précision des mesures dépend donc essentiellement de N_s , qu'il y a intérêt à réduire autant que possible. On peut faire baisser considérablement ce taux des phages libres dus à la lyse spontanée en se fondant sur les remarques suivantes : la majorité des bactéries induites se lysent entre la soixante-cinquième et la quatre-vingtième minute consécutives à l'irradiation, tandis que les phages « spontanés » sont produits constamment par les lyses bactériennes survenant au cours de la multiplication. L'effectif de ces phages est la somme de tous ceux qui ont été produits depuis le début de la culture, jusqu'au moment où l'on effectue le titrage. En ajoutant du sérum antiphage avant la soixante-cinquième minute, on inactive donc ces phages, sans altérer ceux qui, provenant de l'induction, se trouvent encore dans les bactéries induites mais non éclatées. Si à la soixante-cinquième minute, on arrête par dilution l'action de l'anti-sérum, on recueille la plus grande partie des phages issus de l'induction, et seulement ceux qui seront issus de la lyse spontanée après ce moment.

La technique expérimentale est la suivante. Dans une culture de K 12 (λ) ayant atteint 2 à 3.10⁹ bactéries/cm³ depuis une heure, on prélève un échantillon qui est dilué au 1/100 dans du bouillon maintenu à 0°. Cette suspension est irradiée et mise au bain-marie à 37°. Au bout de cinquante-cinq minutes on ajoute 1/20 de sérum anti- λ , on laisse agir pendant dix minutes, puis on dilue au 1/100 dans du tampon 56 additionné de 200 μ g/cm³ de streptomycine maintenu à la température du laboratoire. Au bout de quinze à vingt minutes, on étale en présence de la souche K 12 S.

La streptomycine possède la propriété de tuer les bactéries de la souche qui lui est sensible, d'empêcher les synthèses de phages chez celles qui sont induites, et aussi d'ouvrir celles qui contiennent des

particules de phage mûr, lesquelles sont par conséquent libérées dans le milieu [5].

Cette méthode permet d'abaisser considérablement le taux des phages libres issus des lyses spontanées au cours de la croissance de la culture, pour ne révéler en pratique que les bactériophages mûrs contenus dans les bactéries non éclatées à la soixante-cinquième minute. Elle est préférable à celle adoptée antérieurement [6], dans laquelle on tuait les bactéries au chloroforme, car cette substance tue une certaine fraction des phages libres.

La méthode de titrage du phage libre décrite ici ne permet pas, à elle seule, d'évaluer le pourcentage de bactéries induites. Il faut, pour le connaître, comparer bactéries avec des étalées immédiatement après l'irradiation par une dose élevée en présence de la souche indicatrice. Comme il n'y a pas de réversion par la gélose de *E. coli* K 12 (λ) induit par rayons X, de même que chez *Pseudomonas pyocyanea* [7], chaque bactérie induite donne, dans ces conditions, une plaque.

La précision de la méthode indirecte dépend de la qualité de l'anti-sérum et du taux de l'induction spontanée qui, toutes conditions paraissant égales, peut varier du simple au double. L'inductibilité par les rayons X est, elle aussi, sujette à des variations qui peuvent faire varier dans un rapport de 1 à 2 la fréquence des bactéries induites pour une dose donnée, d'une expérience à l'autre.

RÉSULTATS.

LA RELATION DOSE-EFFET. — Le nombre de bactéries K 12 (λ) induites croît avec la dose de rayons X, passe par un maximum qui se situe entre 10 000 et 15 000 r, puis décroît [5]. Cette décroissance est liée à l'inactivation de la capacité des bactéries induites à produire des bactériophages infectieux. Cette inactiva-

TABLEAU I. — Relation dose-effet avec les rayons X.

Doses en r.	0,3	0,6	1	1,8	3,2	5,6	10	18	32	100	320	1000	3200
R	1,13	1,01	1,15	1,01	1,23	1,52	3,20	4,0	8,5	22	114	290	675
R	1,11	1,23	1,56	1,78	2,26	2,89	4,33	6,9	13,8	39,4	164	415	850
R	1,35	1,53	1,45	1,54	1,88	2,05	4,70	5,3	11,2	39,5	161,5	359	
R		1,22	1,23	1,19	1,32	1,50	2,35		7,6				
R	0,84	1,02	0,96	1,55	1,75	1,95	2,75		7,7	14,7	76	151	
R	1,05		1,4		1,98		4,20		17,4	53	171	536	
R			1,3		1,41		3,50		10,2				
Moy :	1,095	1,20	1,295	1,41	1,69	1,99	3,58	5,35	10,2	33,7	141	351	764
Log	0,04	0,08	0,11	0,15	0,23	0,30	0,55	0,73	1,04	1,53	2,15	2,55	2,88
R-1	0,095	0,20	0,295	0,41	0,69	0,99	2,58	4,35	9,9	32,7	140	350	763
Log R-1	2,98	1,3	1,47	1,61	1,84	1,99	0,41	0,64	0,99	1,51	2,15	2,55	2,88

Valeurs de $R = \frac{Nr}{Ns}$ mesuré au cours de 7 expériences indépendantes avec les rayons X.

tion n'interfère pas sensiblement avec l'induction pour des doses inférieures à 2 ou 3 000 r.

Dans le tableau I sont inscrites les différentes valeurs de $\frac{N_r}{N_s}$ obtenues au cours de 7 expériences indépendantes avec les rayons X, et dans la figure 1 est tracée la courbe de variation

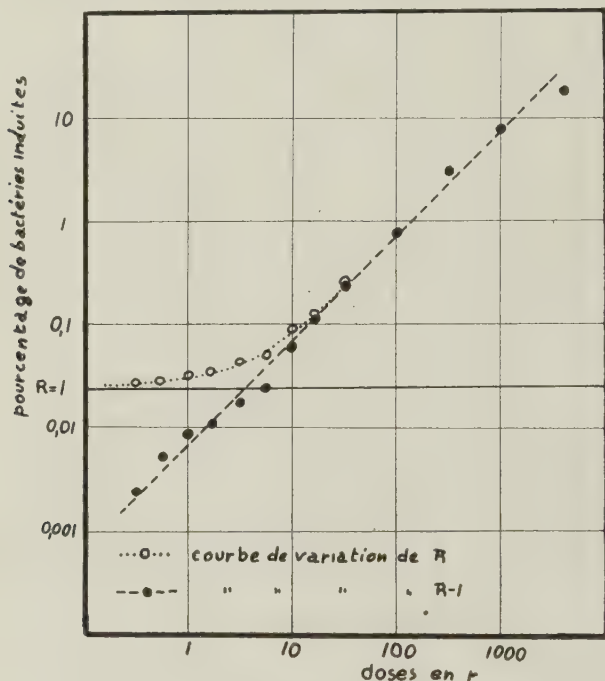


FIG. 1. — Induction de la souche lysogène *Escherichia coli* K 12 (λ) par les rayons X de 0.9 Å. Les cercles clairs correspondent au rapport du nombre de phages libres dans les suspensions irradiées à celui du témoin.

Les points noirs correspondent au rapport du nombre des phages libérés par les lyses effectivement induites par l'irradiation à celui du témoin.

En ordonnées : pourcentage des bactéries induites.

En abscisses : les doses en roëntgens.

Echelle logarithmique.

du pourcentage des bactéries induites en fonction de la dose, ajustée sur les valeurs moyennes de $\frac{N_i}{N_s}$ du tableau I.

La courbe de variation de $\frac{N_i}{N_s}$ en fonction de la dose est une droite que l'on peut suivre dans un intervalle de doses de

1 à 3 000 r, pour une variation du pourcentage des bactéries induites de 0,01 p. 100 à près de 20 p. 100.

Sa pente est égale à 1. Puisque les ordonnées et les abscisses sont toutes deux en même échelle logarithmique, on peut en conclure en raison des faibles doses impliquées, que le phénomène d'induction par les rayons X, chez K 12 (λ), ressort d'un processus à un seul événement.

Dans le tableau II et la figure 2 sont portés les résultats obtenus avec les rayons γ du radiocobalt. Les valeurs de $\frac{N_r}{N_s}$ ont été déterminées avec une précision particulière pour la dose de 3,2 r. L'effet de cette dose est important à connaître en raison des déductions qu'on peut faire étant donné la taille des bactéries et la distribution des ionisations produites par ces rayons.

TABLEAU II. — Relation dose-effet avec les rayons X.

Doses en r	3,2	10	32	100	320
R	1,83	2,35	9,4	29,1	60,5
R	2,36	3,80	16,2	45,5	155
R	1,14	3,20	8,5	21,8	83
R moyen	1,77	3,10	11,3	32,1	99,5
Log R	0,24	0,49	1,05	1,51	1,996
R-1	0,77	2,10	10,3	31,1	98,5
Log R-1	1,89	0,32	1,02	1,49	1,990

Valeurs de R obtenues au cours de 5 expériences indépendantes avec la dose de 3,2 r: 1,74 — 1,72 — 1,85 — 2,50 — 1,54.

Valeur moyenne de R pour les 8 valeurs expérimentales: 1,85.

Induction de *E. coli* K 12 (λ) par les rayons γ . Valeurs de $\frac{N_r}{N_s}$ en fonction de la dose.

La différence entre les deux moyennes de R obtenues avec les rayons X et les rayons γ pour la dose de 3,2 r n'est pas statistiquement significative avec un seuil de confiance de 5 p. 100.

Les courbes expérimentales obtenues avec ces deux rayonnements sont pratiquement confondues, dans l'intervalle des doses étudiées. On peut donc conclure que l'efficacité inductrice des rayons X de 15 keV et des rayons γ du ^{60}Co est la même.

Dans une culture de K 12 (λ), le taux du phage libre est de l'ordre de 1 pour 200 bactéries. Ceci conduit à assigner une

probabilité de lyse de 10^{-4} à 10^{-5} par bactérie par génération. En extrapolant la droite des figures 1 et 2 vers les faibles doses, on trouve que ce taux correspond à une irradiation de l'ordre de 10^{-2} à 10^{-3} r. Or, si on estime que la radiation ionisante naturelle (radioactivité ambiante, rayons cosmiques) fournit une dose journalière de 10^{-4} r environ, ceci donne pour une génération bactérienne de 28/mn une dose de l'ordre de 2.10^{-6} r. On voit qu'elle est très insuffisante pour être tenue comme cause principale de la lyse spontanée.

Malgré ces raisons *a priori* d'obtenir un résultat négatif, des

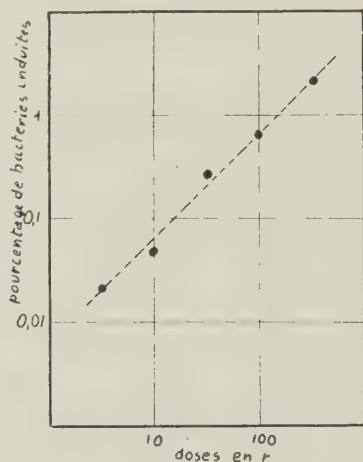


FIG. 2. — Induction de la souche lysogène *Escherichia coli* K 12 (λ) par les rayons γ du ^{60}Co . Mêmes coordonnées qu'à la figure 1.

expériences ont été effectuées pour comparer le taux des phages libres des cultures ayant poussé dix-huit heures à la surface du sol et au fond d'un puits à 30 m sous terre, dans lequel les ionisations correspondant à la radiation naturelle sont huit fois moins abondantes qu'à la surface. En outre, des cultures ont été mises à l'étuve sous 2,5 cm de plomb afin d'augmenter par les effets de gerbes l'ionisation due aux rayons cosmiques. Il n'a été trouvé, au cours de ces expériences, aucune différence significative entre les taux des phages libérés dans ces diverses conditions.

LE FACTEUR TEMPS-DÉBIT. — La dose en r est le produit du débit du rayonnement par le temps de l'irradiation. L'action inductrice d'une dose donnée est-elle indépendante des deux

termes de ce produit, autrement dit y a-t-il réciprocity entre temps et débit ?

On peut modifier le débit du rayonnement au niveau de l'échantillon irradié en faisant varier la distance de cet échantillon à l'anti-cathode et l'intensité du courant de chauffage du filament.

La durée de l'irradiation est déterminée par un disque de plomb fenêtré de 4 mm d'épaisseur, tournant à 1 tour par seconde.

Dans le tableau III sont donnés les nombres de phages observés avec une dose de 10 r pour une variation de débit selon un facteur 10^4 .

TABLEAU III.

Débit en r/minute	60,000	6.000	600	60	6	0
Durée d'exposition en secondes	10^{-2}	10^{-1}	1	10	100	0
N_r	1.816	1.834	1.909	2.311	2.239	
N_s						804

Nombre de phages N_r libérés dans des suspensions bactériennes, soumises à une même dose de 10 r de rayons X, avec des débits variables. N_s nombre de phages comptés dans la culture témoin non irradiée.

La même dose donnée en dix fois 10^{-3} secondes, à une seconde d'intervalle, donne 2 205 phages.

Pour des débits inférieurs à 6 r/minute, on ne peut utiliser le tube Holweck. L'on est obligé de recourir à une source de radium. Celle-ci, à 15 cm de la préparation, donne un débit de 0,06 r/minute et le temps nécessaire à l'obtention d'une dose de 10 r est de 10^4 seconde.

En utilisant rayons X et rayons γ , on a pu faire varier le débit par un facteur 10^6 .

Le tableau IV groupe les résultats de plusieurs expériences indépendantes. Pour les raccorder entre elles, l'on considérera non pas le nombre absolu de phages mais le rapport $\frac{N_r}{N_s}$ du nombre des phages contenus dans les échantillons irradiés à celui des phages produits dans des témoins.

Les colonnes marquées d'une astérisque concernent les valeurs observées au cours d'une même expérience comparative.

L'estimée S de l'écart type de l'ensemble des valeurs de $\frac{N_s}{N_r}$ est 3,9; l'estimée de l'erreur type de la différence entre les deux moyennes est 2,05.

On en tire la valeur de la statistique t de Student, soit 0,245.

Comme il y a 6 degrés de liberté ($n - 2$) et que la valeur seuil

de t pour ce nombre est 2,4, on peut considérer que l'écart entre les deux moyennes n'est pas significatif.

On comparera les chiffres du tableau IV avec ceux du tableau I pour la dose de 10 r. Celle-ci, administrée en dix secondes, donne une moyenne de $\frac{N_i}{N_r}$ égale à 3,58 calculée sur 7 expériences différentes.

TABLEAU IV. — Actions comparées d'une dose de 10 r de rayons X débités en 10^{-2} sec. et de rayons γ du radium débités en 10^4 sec.

Rayons X

Nr	1816	567	1385	3410	10427 ^(x)
Ns	804	232	302	675	2638
Nr/Ns	2,26	2,44	4,58	5,03	3,96

valeur moyenne de Nr/Ns = 3,65

Rayons γ

Nr	610	569	8875 ^(x)
Ns	301	143	2638
Nr/Ns	2,03	3,97	3,38

valeur moyenne de Nr/Ns = 3,13

On peut donc conclure de ce qui précède que pour l'induction la réciprocité est validée dans ces expériences le long d'un intervalle de variation des débits au moins égal à 10^6 .

ACTION DE LA TEMPÉRATURE. — En raison de leur maniabilité, les bactéries se prêtent bien à l'étude des effets de la température sur l'action inductrice des rayons X.

Dans le tableau V sont groupés les résultats de trois expériences indépendantes dans lesquelles les doses inductrices sont 25 et 50 r.

On peut en conclure que dans l'intervalle étudié, la température n'a aucune influence sur l'induction de K 12 (λ) par les rayons X.

Il faut noter que des cultures témoins soumises pendant dix minutes à différentes températures, jusqu'à 45° n'ont pas montré de différence dans le nombre des phages libérés.

TABLEAU V.

Température	25 r		50 r
	N _r	N _r	N _r
0°	36	360	1602
10°	35	575	1242
20°	22	515	1912
30°	42	468	1121
N _s	1,4	43	122

N_r, nombre de phages mesurés dans des suspensions irradiées à différentes températures. N_s, nombre de phages mesurés dans la suspension témoin.

ACTION DE LA TENSION D'OXYGÈNE. — On admet généralement que l'existence d'un effet oxygène, c'est-à-dire l'augmentation de l'efficacité du rayonnement en présence de ce gaz, témoigne de ce que l'effet primaire est en relation avec une réaction d'oxydation dans laquelle intervient l'oxygène moléculaire, par exemple par l'intermédiaire de radicaux HO₂. Une autre interprétation fondée sur le post-effet résultant de l'action de l'oxygène et sur l'action d'hydroperoxydes organiques a été proposée en particulier par Alper et par Latarjet et Brinton (Congrès de Photobiologie d'Amsterdam, 1954). En présence d'oxygène les radicaux peuvent former des hydroperoxydes organiques à vie longue qui se décomposent peu à peu ultérieurement en libérant des radicaux actifs.

Ainsi l'étude de l'influence de l'oxygène est-elle susceptible de fournir des indications sur les réactions mises en jeu dans les premières étapes de l'induction. La figure 3 montre les résultats obtenus au cours d'expériences effectuées dans ce but. On y voit que l'induction n'est pas sensible à la tension d'oxygène. Etant donnée l'influence possible des facteurs métaboliques dans la manifestation de ce phénomène [8], on a étudié des bactéries provenant soit de cultures en fin de croissance exponentielle selon la technique habituelle, soit de cultures ayant atteint la phase stationnaire depuis dix-huit heures. Dans ce dernier cas, l'activité inductrice de l'irradiation est près de dix fois moindre que dans le premier. Ceci est en rapport avec le fait que les bactéries lysogènes carencées perdent progressivement leur inductibilité [9].

On pourrait se demander, étant donné le faible pourcentage de bactéries induites dans ces expériences, si celles qui sont inductibles ne sont pas dans un état physiologique tel que l'effet

oxygène ne s'y manifeste pas. Il n'en est rien, car la « survie » de la division bactérienne, qui est très sensible à la tension d'oxygène au moment de l'irradiation, décroît exponentiellement en fonction de la dose, ce qui montre que la population bactérienne est homogène à cet égard. En outre, dans un travail antérieur, il a été montré que la courbe d'induction n'est pas modifiée dans son ensemble par les variations de la tension d'oxygène,

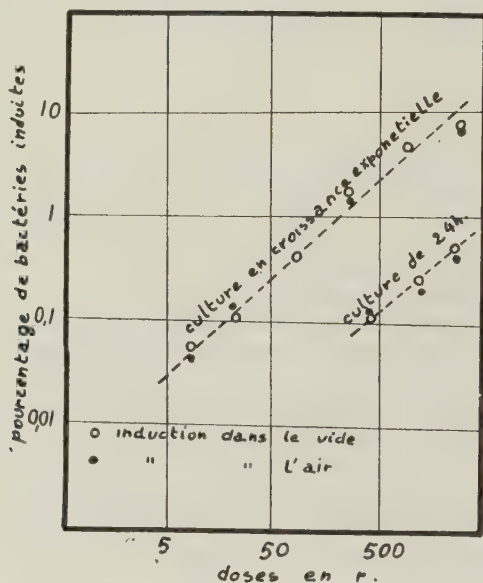


FIG. 3. — Action de la tension d'oxygène sur l'induction de K12(λ) par les rayons X. Mêmes coordonnées qu'à la figure 1.

en particulier à des doses auxquelles la majorité des bactéries sont induites.

Discussion.

Dans ce qui va suivre, le mot « cible » sera utilisé sans qu'il lui soit attribué un sens précis d'organe à la forme et aux contours définis. Ce terme concerne toute structure compacte ou non, toute espèce moléculaire dispersée ou concentrée en un point du cytoplasme où se produit l'effet primaire.

LA RELATION ENTRE LA DOSE ET L'EFFET. — La question de l'activité biologique des faibles doses de radiations ionisantes suscite un vif intérêt puisque, du fait des progrès de la technique,

les hommes sont de jour en jour plus largement exposés à leurs actions.

Les travaux de nombreux auteurs qui se sont attachés depuis la découverte de Müller en 1927, à l'action mutagène des radiations ionisantes, montrent tous que les courbes représentatives de la relation entre les faibles doses et la fréquence des mutations induites sont des droites qui s'extrapolent au point d'ordonnée 0 et d'abscisse 0. Pour ne citer que le plus récent, Spencer et Stern [40] ont pu mesurer le taux de l'ensemble des mutations létales induite chez la drosophile par des doses aussi faibles que 25 r. Ce taux varie proportionnellement à la dose (1), et la droite représentative de cette variation passe par l'origine des coordonnées.

Bonnier et Lünig [41] ont constaté, en ce qui concerne la mutation induite de deux caractères (white et forked) de la drosophile, que la courbe représentative de la relation dose-effet s'extrapolait au-dessus de l'origine. Ce fait a été confirmé par Müller et coll. [42]. Il serait lié à une hétérogénéité de la population des spermatozoïdes irradiés, fonction de l'âge de la mouche.

Une déviation de ce type n'infirme pas la proportionnalité pour les faibles doses. Elle montre seulement que des facteurs inter-courants peuvent modifier le cours des événements qui font suite à l'effet primaire et que l'hétérogénéité de la population peut influencer considérablement sur le résultat final.

La relation exponentielle entre la dose et l'effet exprime que le taux des lésions observables est proportionnel à la densité des événements élémentaires produits.

Si, pour produire l'induction d'une bactérie, il faut un événement dans une cible déterminée (espèce moléculaire, organite), la frac-

tion $\frac{N}{N_0}$ des bactéries induites en fonction de la dose exprimée en roentgens est :

$$N/N_0 = (1 - e^{-\alpha D}) \quad (1)$$

où α est l'inverse de la dose qui produit en moyenne un événement efficace (en supposant ceux-ci distribués selon une série de Poisson).

En dérivant, et si αD est suffisamment petit (faibles doses), on peut écrire :

$$d \frac{N}{N_0} = e^{-\alpha D} dD \approx \alpha dD$$

(1) La proportionnalité entre le taux de mutations induites et la dose n'est qu'une approximation de la relation exponentielle qui relie, en toute rigueur, ces deux qualités. Elle n'est légitime qu'en raison des faibles taux impliqués dans ces travaux.

Dans ces conditions, la courbe exponentielle est pratiquement confondue avec une droite de pente α . Dans la représentation logarithmique adoptée ici (fig. 1), la courbe représentative est une droite de pente égale à l'unité, qui coupe l'ordonnée 100 p. 100 en point d'abscisse égale à $1/\alpha$.

Un raisonnement inverse conduit à partir de résultats exprimés figures 1 et 2 à la conclusion que l'induction de K 12 (A) relève d'un processus à 1 coup, ou, pour utiliser l'expression proposée par Gray, monotopique.

L'égale efficacité d'action inductrice des rayons X de 15 kev d'énergie moyenne et des rayons γ du ^{60}Co de plus d'un Mev, montre, en raison de la distribution très dissemblable des ionisations produites par ces deux rayonnements, que l'induction se trouve soumise à la survenue d'une seule ionisation dans la « cible » induction.

La question de savoir [8] si au cours de la carence, l'inductibilité décroît tout en se maintenant chez toutes les bactéries, ou si elle disparaît chez une fraction de plus en plus étendue de la population ne saurait être discutée ici.

LA RELATION DOSE-INDUCTION AUX FAIBLES DOSES. — Les données des tableaux I et II et des figures 1 et 2 vont nous permettre d'aborder la discussion de la question suivante : la relation de proportionnalité à laquelle obéit l'induction est-elle valable pour toutes les doses si faibles soient-elles ? En d'autres termes, l'efficacité d'une irradiation se modifie-t-elle au-dessous d'une certaine quantité d'ionisations dans la bactérie ? Si l'effet primaire est dû à la production d'une seule paire d'ions dans la « cible », toute déviation à la proportionnalité ne peut être due qu'aux événements survenant en dehors de celle-ci.

Ces événements seraient susceptibles d'influer sur le déroulement de la chaîne des réactions menant de l'effet primaire à la lésion observable de deux manières :

a) Elles peuvent entraver ces réactions et diminuer, par l'altération d'un organite dans lequel elles se produisent, l'efficacité de l'action inductrice ;

b) Elles peuvent être nécessaires à l'accomplissement de ces réactions, en activant certaines molécules qui interviennent dans leur déroulement.

Trois cas peuvent être envisagés.

I. — On considérera pour commencer le cas d'une population bactérienne homogène dans laquelle toutes les bactéries contiennent la même cible induction et dans laquelle les cibles hypothétiques envisagées en *a* et *b* sont soit totalement inhibitrices, soit totalement adjuvantes.

La relation (1) doit alors s'écrire :

$$\frac{N}{N_0} = (1 - e^{-aD}) k(D) \quad (2)$$

ou $k(D)$ est une quantité positive fonction de la dose.

Comme l'expérience montre que dans un large intervalle de doses la relation (1) rend bien compte des résultats, il faut que l'expression $k(D)$ soit sensiblement égale à 1 dans cet intervalle.

Parmi les expressions qui peuvent satisfaire à cette condition, la série de Poisson paraît être la plus adaptée, car l'irradiation produit des événements élémentaires discontinus, dont l'intervention est liée à la probabilité de survenir dans une espèce moléculaire déterminée, c'est-à-dire dans une cible.

S'il faut n de ces événements pour mettre en jeu le phénomène (a), on peut écrire :

$$\frac{N}{N_0} = (1 - e^{-aD}) e^{-aD} \left[1 + aD + \frac{(aD)^{n-1}}{(n-1)!} + \dots + \frac{(aD)^{n-1}}{(n-1)!} \right] \quad (3)$$

Pour le phénomène b , on a :

$$\frac{N}{N_0} = (1 - e^{-aD}) \left(1 - e^{-bD} \left[1 + bD + \frac{bD^2}{2} + \dots + \frac{(bD)^{n-1}}{(n-1)!} \right] \right) \quad (4)$$

La déviation à la proportionnalité serait d'autant plus sensible que n est plus grand.

Si l'on suppose que $n = 1$, cas le plus défavorable à la détection d'une déviation, et si l'on considère le cas où les deux cibles hypothétiques peuvent coexister, on a :

$$\frac{N}{N_0} = (1 - e^{-aD}) (1 - e^{-bD}) e^{-aD} \quad (5) \quad (2)$$

a) Aux doses élevées, le terme $1 - e^{-bD}$ est très voisin de 1 et la déviation sera due à e^{-aD} . Comme la proportionnalité se constate expérimentalement jusqu'à 2 000 r au moins, et qu'une déviation de 10 p. 100 est à la limite de la signification, on a pour

$$e^{-aD} \begin{array}{c} \diagup \\ \diagdown \end{array} 0,9 \quad aD \begin{array}{c} \diagup \\ \diagdown \end{array} 0,12 \quad \text{c.à d. } a \begin{array}{c} \diagup \\ \diagdown \end{array} \frac{20\,000}{1}$$

(2) On peut envisager le cas où la cible a est partiellement inhibitrice et la cible b partiellement activante. La situation serait symétrique de la précédente et on aurait $k(D) = (1 - e^{-a'D}) k(D)$, $= e^{-b'D}$.

L'expression [5] deviendrait : — $= (1 - e^{-a'D}) (1 - e^{-a'D}) e^{-b'D}$. Les conclusions de ce qui va suivre n'en seront pas modifiées.

Cette dose correspond à une radiosensibilité près de deux fois plus petite que celle de la cible-induction et beaucoup plus petite que celle de la capacité des bactéries induites par les rayons X de permettre la maturation du phage [5]. Il en résulte donc que l'éventualité a n'intervient pas sensiblement pour les doses inférieures à 2 000 r (dans nos conditions expérimentales) puisque la cible correspondante serait masquée par la cible induction plus grande qu'elle.

b) L'éventualité b est plus intéressante, elle s'attache en effet à l'action des très faibles doses, où le facteur e^{-ad} est très voisin de 1.

La déviation qu'elle entraînerait alors serait une déviation par défaut. La relation (5) devient celle d'un processus à deux cibles inégales. Le facteur $(1-e^{-bd})$ correspond à une cible adjuvante hypothétique dont il s'agit d'évaluer la dimension minimum. Une telle estimation peut être faite en attribuant à b différentes valeurs, et en déterminant celle à partir de laquelle la modification de Nr qu'elle entraîne devient significative.

TABLEAU VI.

Dose	0,3	0,6	1	1,8	3,2
n	5	5	7	5	7
\bar{x}'	1,095	1,20	1,295	1,41	1,69
Valeur seuil de t pour n	2,8	2,8	2,5	2,8	2,5
Valeur de t pour $\bar{x} = 1$	2,01	2	4,15	3	4,25
y'	1,094	1,19	1,51	1,56	2
Valeur de t pour $\bar{x} = y'$	-	1	0,2	1,02	1,9

Les données du tableau I ont été analysées (tableau VI) à l'aide de la statistique t de Student afin de répondre aux questions suivantes :

1° A partir de quelle dose, le rapport x' du nombre des phages dans les échantillons irradiés à celui des phages du témoin est-il différent du rapport théorique $x = 1$ avec un seuil de signification de 5 p. 100 ?

2° Ce rapport est-il significativement différent de celui $x = y'$ que l'on pourrait calculer à partir des données obtenues aux doses supérieures à 32 r en supposant que la droite ajustée sur les points expérimentaux se prolonge vers les faibles doses ?

La réponse à ces deux premières questions est donc :

1° L'accroissement du nombre de phages dans les échantillons irradiés par rapport au témoin est significatif de la dose de 1 r incluse (3).

2° Les valeurs de y calculées en se fondant sur la relation de proportionnalité ne sont pas différentes avec un seuil de signification de 5 p. 100 de celles x' mesurées. L'hypothèse de la proportionnalité d'action pour la dose de 1 röntgen est donc compatible avec les données expérimentales.

c) Pour des doses suffisamment grandes, de l'ordre de 300 000 röntgens, on peut admettre avec une assez bonne approximation, en raison de la superposition des trajectoires électroniques, que les deux rayonnements X et γ utilisés dans ce travail produisent leurs ionisations de façon homogène. Ceci n'est plus vrai quand les doses sont faibles.

1° Les photons de 15 kev, absorbés par les atomes légers dont les bactéries et le milieu sont constitués en presque totalité, transmettent leur énergie à peu près intégralement à des photo-électrons, dont le parcours moyen est de l'ordre de 5 μ . Ils dissipent leur énergie en créant près de 430 paires d'ions. Pour une dose de 1 röntgen, il se forme dans le milieu utilisé ici, près de $1,7 \cdot 10^{12}$ ionisations par centimètre cube, qui sont produites par $4 \cdot 10^9$ photons. Ceci équivaut à l'absorption d'un photon par 250 μ^3 de milieu irradié. La probabilité pour qu'une bactérie soit traversée par un photo-électron peut être évaluée par la méthode du volume associé proposée par Lea. Si on suppose la trajectoire des photo-électrons rectiligne, on peut lui associer un volume cylindrique dont la génératrice est égale à la longueur de cette trajectoire, et la section égale au diamètre moyen de la bactérie. Celle-ci sera traversée, si son centre se trouve en un point quelconque du volume associé.

Avec 15 kev, le volume associé est de 2,5 μ^3 . Pour la dose de 1 röntgen, la probabilité que deux volumes associés aient un point commun est de l'ordre de 1 p. 100, de sorte que s'il fallait qu'une bactérie soit traversée par deux trajectoires pour être induite, l'efficacité inductrice de 1 r serait de 1/100 de celle observée, celle de 10 r, le 1/10 environ. Il en résulte qu'avec la précision de 10 p. 100 inhérente à la mesure de l'action inductrice, une déviation très importante à la relation de proportionnalité serait apparue à des doses supérieures à 10 röntgens.

On peut donc conclure qu'une trajectoire de photo-électron de 15 kev, c'est-à-dire en définitive un seul photon, suffit à elle seule à produire l'induction, à condition bien entendu qu'une des

(3) Si on adopte 10 p. 100 au lieu de 5 p. 100 pour valeur du seuil, l'accroissement du nombre de phages observés dans les échantillons soumis à 0,3 et 0,6 r devient significatif.

ionisations se produise dans la cible induction. En moyenne une bactérie traversée par un de ces photo-électrons est le siège d'une cinquantaine d'ionisations. L'hypothèse d'une cible adjuvante nécessitant plusieurs ionisations ne peut donc pas être écartée : celle de plusieurs photons, sûrement. On peut donc conclure de cette analyse qu'il ne saurait y avoir de baisse de l'efficacité à l'action inductrice d'un rayonnement de 15 kev, si faible soit la dose, puisqu'un seul photon constitue la quantité la plus faible sous laquelle cette énergie radiante peut être administrée.

2° Le ^{60}Co émet deux photons, l'un de 1,18 Mev, l'autre de 1,32 Mev. Par diffusion Compton dans la matière, ils transmettent leur énergie à des électrons dont l'énergie moyenne est de l'ordre de 0,5 Mev.

La fraction n_E de l'ionisation totale qui est produite par des électrons d'énergie égale ou inférieure à E est donnée par la relation

$$n_E = \frac{E}{T} \left(1 + f_E \frac{T}{E} \right) \text{ (d'après Gray [13])}$$

où T est l'énergie de l'électron primaire, et $f = B, \frac{1}{R}$ caractérisant le pouvoir d'arrêt des atomes du milieu. On trouve que pour $E = 100$ kev, $T = 500$ kev et $f = 0,18$, $n_E = 0,4$. Par conséquent plus de 60 p. 100 de l'ionisation sont constitués par des paires d'ions produits par des électrons d'énergie supérieure à 100 kev ; leur distance moyenne évaluée d'après les tables de Lea [14] est supérieure à $0,16 \mu$. Comme l'épaisseur moyenne d'une bactérie est de $0,6 \mu$, il s'y produit moins de 4 paires d'ions chaque fois qu'elle est traversée par un électron de plus de 100 kev. Ce nombre est donc bien inférieur à celui fourni par les photo-électrons de 15 kev.

On peut estimer que, dans un milieu soumis à un rayonnement γ , 20 à 30 p. 100 de l'ionisation proviennent d'électrons de 15 kev. Une baisse de l'efficacité inductrice ne pourrait par conséquent provenir que des ionisations formées par les électrons rapides. Or avec une dose de 3,2 r il y a 6 ions dans $1 \mu^3$. L'électron d'énergie supérieure à 100 kev en moyenne ne contribuant que pour la moitié des ionisations, il ne passe une trajectoire supérieure à 100 kev que dans $2 \mu^3$ en moyenne. Puisqu'une bactérie a un volume de $0,4 \mu^3$, la probabilité pour qu'elle soit traversée par deux de ces électrons est de 0,25. Par conséquent, s'il fallait l'ionisation produite par deux trajectoires électroniques primaires pour induire les bactéries, on trouverait, en tenant compte des électrons de faible énergie, une baisse de l'efficacité de moitié pour la dose de 3 roentgens. Cette baisse serait manifeste dans nos conditions expérimentales.

On peut donc conclure qu'un électron de 0,5 Mev peut, en

quelque point de sa trajectoire que ce soit, induire les bactéries si une des ionisations se produit dans la cible induction.

Pas plus que les photons de 15 kev, ceux du ^{60}Co ne sauraient avoir de baisse de l'efficacité vers les faibles doses.

Puisqu'avec ces deux rayonnements, l'absence d'une déviation à la proportionnalité est démontrée, il est facile de l'étendre à toute radiation ionisante dont les photons donnent naissance à des électrons produisant plus de quelques ionisations, c'est-à-dire aux photons d'une centaine d'électronvolts. Une telle conclusion concerne également les photons d'énergie supérieure à 1 Mev.

II. — Cas d'une population hétérogène où la radiosensibilité de l'induction varie d'une bactérie à l'autre mais relève d'un processus à un coup.

Avec la relation 1, on admet implicitement que la population bactérienne est homogène, que la radiosensibilité de l'induction est la même chez tous les individus de la population.

Si α est variable, soit $\alpha_1, \alpha_2, \dots, \alpha_n$, et se distribue en n classes de fréquence f_1, f_2, \dots, f , l'expression 1 devient.

$$\frac{N_0}{N} = f_1 (1 - e^{-\alpha_1 D}) + f_2 (1 - e^{-\alpha_2 D}) + \dots + f_n (1 - e^{-\alpha_n D}) \quad (6)$$

Si les exposants αD sont petits, on peut écrire :

$$\frac{N}{N_0} = (f_1 \alpha_1 + f_2 \alpha_2 + \dots + f_n \alpha_n) D = \bar{\alpha} D \quad (7)$$

où α représente la cible moyenne, de l'ensemble.

La relation dose-effet est représentée par une droite de pente égale au terme entre parenthèses. L'existence d'une hétérogénéité de la population se traduira, pour les fortes doses, par une déviation par défaut de la proportionnalité.

Comme l'expérience montre que dans l'induction de K 12 (λ) l'approximation (7) est légitime jusqu'à un pourcentage de bactéries induites au moins égal à 10 p. 100, on peut en conclure que dans l'ensemble, la population est homogène, ou que la variabilité de α est réduite, la fréquence d'une des classes comparée à celle des autres étant grande dans un rapport de 9 à 1 au moins.

III. — On discutera brièvement du cas, assez peu vraisemblable, où l'hétérogénéité de la population bactérienne porte non seulement sur la dimension des cibles, mais aussi sur leur multiplicité, sur leur rôle au sein d'une bactérie une fois qu'elles sont activées par l'irradiation.

Une telle complexité pourrait se résoudre en une relation dose-effet linéaire. Cependant, pour qu'elle se réalise, il est indispensable qu'il se forme dans la bactérie autant d'événements efficaces qu'il y a de telles cibles. Leur nombre doit être d'autant plus grand que l'intervalle dans lequel la linéarité est exigée est lui-

même plus étendu. Or, nous avons vu qu'il suffit d'un seul photon pour que la relation linéaire soit satisfaite ; il faudrait donc admettre que ce photon puisse « tout faire ».

La conséquence de ce qui précède est qu'il n'existe pas de limite inférieure à l'action des radiations ionisantes, du moins en ce qui concerne l'induction. En particulier, l'on est en droit d'affirmer que les ionisations naturelles issues des rayons cosmiques et de la radioactivité ambiante doivent contribuer à la lyse « spontanée », en fonction de leur densité. Nous avons dit plus haut que ces ionisations ne sauraient en rendre compte que d'une faible fraction.

On n'a pas discuté l'éventualité d'un effet indirect lié aux ionisations produites dans le milieu extérieur aux bactéries, car dans nos irradiations effectuées en bouillon l'induction n'est pas influencée par ce milieu qui s'est avéré un bon protecteur contre les effets indirects dus aux radiations de l'eau irradiée et que des variations dans la durée d'irradiation de 10^6 fois sont sans effets sur le résultat final, lequel est par ailleurs insensible aux facteurs thermiques.

LE FACTEUR TEMPS. — L'énergie libérée dans la matière par une quantité de radiations ne dépend pas du débit sous lequel cette quantité est administrée. Entre l'effet primaire et l'effet observable, il peut y avoir une série de réactions dont le cours peut être modifié par des facteurs intercurrents, lesquels dépendent du matériel irradié.

La réciprocité n'est pas corrélative de la proportionnalité entre la dose et l'effet. Dans certains systèmes chimiques, l'irradiation produit des radicaux qui initient des réactions en chaîne. Si par rencontre deux de ces radicaux se neutralisent, la réaction s'arrête. Tel est par exemple le cas de la polymérisation du styrolène [15] dans lequel les chaînes de plus en plus longues se forment par fixation d'une nouvelle molécule de styrolène sur la valence libre avec transfert de celle-ci à l'extrémité de la chaîne ainsi formée. Comme l'annihilation des radicaux dépend de leur probabilité de rencontre, c'est-à-dire de leur concentration à chaque instant, on voit que les débits élevés favorisent les combinaisons de radicaux et par conséquent sont moins efficaces à doses égales que les débits faibles. Dans cet exemple, le taux de polymérisation est proportionnel à la dose et à la racine carrée du débit.

Il existe d'autres réactions où l'effet dépend du débit, lequel est affecté d'un exposant toujours inférieur ou égal à 1. Par contre, il n'existe pas, à notre connaissance, de réaction de radicaux dans laquelle cet effet soit proportionnel au débit affecté d'un exposant supérieur à l'unité.

Dans les systèmes biologiques les plus simples, la réciprocité se trouve généralement satisfaite. Les nombreuses études portant sur la production de mutations chez la *Drosophile* montrent la validité étendue de cette relation. Pour ne citer que les plus récents, Uphoff et Stern [16] arrivent à vérifier la réciprocité pour une variation de débit égale à 10^5 . En considérant l'ensemble des résultats obtenus sur ce sujet, Müller [17] conclut à sa validité pour une variation de débit de l'ordre de 300 000.

Sur d'autres organismes, la réciprocité a également été établie pour des variations de débits importantes. Latarjet [18-19] a montré que sur le bactériophage dysentérique C16 et le colibacille Y6R, le débit n'influe pas sur l'efficacité de l'action létale pour une variation d'au moins cinq cents fois.

Une condition essentielle à respecter dans une telle étude est l'invariabilité du matériel irradié ; ceci est facile à réaliser avec les microorganismes. Chez la *Drosophile*, la population des gonades peut être considérée comme étant invariable pendant une durée de plusieurs jours.

Si l'on envisage d'autres phénomènes que la production de mutations ou l'induction des bactéries lysogènes, il est possible de rencontrer des écarts à la réciprocité. Le mécanisme en est d'analyse malaisée en raison de la complexité des interactions possibles et des incertitudes sur ce qui est réellement mesuré. Tel est le cas de l'érythème de la souris [20] ou des perturbations de la division des œufs de *Drosophiles* [21].

Que la réciprocité soit si souvent valable dans les systèmes biologiques et qu'elle puisse être en défaut dans des systèmes chimiques plus simples surprend quelque peu. L'explication réside probablement dans la grande spécificité des réactions impliquées dans la mutation d'un gène ou dans le phénomène de l'induction. Dans un cas comme dans l'autre, c'est un phénomène de tout ou rien ; il y a ou il n'y a pas de mutation ou d'induction.

On peut, en revanche, comprendre que pour des lésions peu spécifiques résultant de facteurs variés (érythème, retard à la division) des réactions diverses peuvent se produire, comme l'accumulation de produits toxiques en rapport avec un post-effet, associé à des modifications métaboliques susceptibles de modifier la concentration de ces produits.

La validité d'une réciprocité au moins égale à 10^6 trouvée expérimentalement entre le débit et le temps, dans l'action inductrice d'une dose de 10 r peut être étendue grâce aux conclusions tirées de l'étude de la relation dose-effet. S'il suffit d'un seul événement élémentaire dans le volume d'une bactérie (à condition qu'il survienne dans la cible induction) pour l'induire, on peut prédire que la validité de la réciprocité se trouve nécessairement

devoir exister vers les débits les plus faibles. On peut toutefois concevoir une déviation pour les débits très élevés à des doses très fortes, si l'induction se fait par l'intermédiaire d'un radical produit au voisinage de la cible. Dans ces conditions, les chances de recombinaison de deux radicaux ne seraient pas nulles et on pourrait assister à une diminution d'autant plus marquée de l'efficacité que les débits seraient plus élevés.

*
* *

Les conclusions auxquelles on aboutit pour les deux relations de proportionnalité et de réciprocité ont-elles une portée générale ? En particulier, peuvent-elles être étendues aux mutations des organismes supérieurs ? Du point de vue formel, l'induction est une mutation létale, puisqu'elle intéresse un caractère (le prophage) inscrit dans la trame héréditaire de la bactérie et qu'elle entraîne la mort de celle-ci. Cet argument, par analogie, ne saurait évidemment suffire. L'hypothèse de la cible adjuvante qui a été discutée ici est beaucoup moins facile à infirmer chez les organismes supérieurs. En ce qui concerne la production de mutations chez la *Drosophile*, le taux des radiomutations est le même que l'irradiation porte sur l'ovule ou sur le spermatozoïde. C'est-à-dire que si le cytoplasme intervient dans l'efficacité inductrice de l'irradiation, ce ne peut être que par la fraction commune aux deux gamètes ; le volume adjuvant hypothétique dont nous avons parlé ne saurait excéder celui du gamète mâle dont la tête est de l'ordre de $500 \mu^3$. En se reportant aux données de Spencer et Stern (*loc. cit.*), on trouve que pour la dose de 50 r où la relation de proportionnalité est encore vérifiée de façon indubitable, la cible adjuvante devrait avoir un diamètre de l'ordre de $0,3 \mu$ pour entraîner un écart décelable. D'après ces évaluations, le diamètre de la cible, qui correspondrait à l'ensemble des mutations létales étudiées, serait de l'ordre de $0,05 \mu$, c'est-à-dire moins du 1/100 de celui de la cible hypothétique. Cette dernière serait encore faible par rapport aux dimensions de la cellule ou du noyau. Elle serait toutefois très supérieure aux cibles les plus grandes mesurées par les rayons X. Son existence est donc bien douteuse et il n'est pas déraisonnable de penser que pour l'induction de mutations létales chez la *Drosophile* (et probablement pour n'importe quelle mutation) il n'existe pas de baisse de l'efficacité à l'activité mutagène des faibles doses de radiations ionisantes.

L'induction comme moyen de mesure de l'activité biologique des rayonnements ionisants complexes. — Entre la mesure physique de la quantité des ionisations produites au cours de l'absorption de corpuscules et de radiations de grande énergie

émis par une explosion nucléaire ou par une pile, et l'effet biologique que ces ionisations sont susceptibles de produire, règne une incertitude.

Le test biologique est supérieur, qualitativement, aux autres tests physiques ou chimiques fournis par les chambres d'ionisation, par la plaque photographique, etc., puisqu'il représente déjà un phénomène cellulaire dont l'extrapolation à d'autres phénomènes biologiques paraîtra moins hasardeux. L'induction d'une suspension de bactéries lysogènes donne la mesure de la dose totale reçue au cours de l'irradiation; elle intègre directement le nombre d'ionisations reçues. Sa sensibilité permet avec *E. coli* K 12 (λ) d'atteindre des doses de l'ordre du röntgen. Elle est ainsi très supérieure à celle que comporte l'action létale sur les bactéries ou les virus qui ne dépassent pas quelques centaines de röntgens.

Pour effectuer un dosage à l'aide de ce test, il suffit d'exposer une suspension de ces bactéries à l'action des rayons à mesurer et d'effectuer une induction comparative avec une seule dose connue de rayons X ou γ . En coordonnées logarithmiques, la courbe représentative de l'induction en fonction de la dose étant une droite de pente 1, il suffit donc d'un seul point pour la déterminer. C'est la précision avec laquelle ce point est connu qui donne la précision du dosage, c'est-à-dire l'intérêt de répéter la mesure sur plusieurs échantillons. Ce faisant, on peut atteindre sur l'estimation de la dose inconnue une précision de ± 10 p. 100. Cette méthode a été employée pour évaluer les doses reçues par les gonades au cours de l'exploration radiologique de la région pelvienne [22].

RÉSUMÉ.

L'induction de K 12 (λ) a été étudiée à l'aide de radiations ionisantes.

1° L'induction est un phénomène à un coup.

2° Le diamètre de la « cible » induction est de l'ordre de 90 à 100 M chez les bactéries K 12 (λ) dans des conditions d'inductibilité optimum, et de protection chimique contre les effets indirects.

3° La relation entre la dose et l'effet est exponentielle. Aux faibles doses utilisées dans ce travail, elle se confond sensiblement avec une relation linéaire.

4° La réciprocité (temps-débit) a été observée pour une variation de débit de 10^6 .

5° L'induction est indifférente à la température imposée pendant l'irradiation, entre 0° et 40°.

6° Elle n'est pas sensible à la présence d'oxygène.

7° Un seul photon suffit à produire l'induction avec une pro-

habilité qui est fonction de la dose. Ceci permet de conclure à la validité de la relation dose-effet et de la réciprocité pour toute dose, si faible soit-elle.

8° L'utilisation pratique de l'induction comme moyen biologique de mesure des radiations ionisantes est envisagée.

Je tiens à remercier MM. R. Latarjet et M. Lefort pour les critiques constructives qu'ils ont faites aux idées exposées dans ce travail.

SUMMARY.

The induction of K 12 (λ) has been studied with the aid of ionizing radiations.

1° Induction is a single hit phenomenon.

2° The diameter of the target of the K 12 (λ) bacteria for induction is of the order of 90 to 100 μ under conditions of optimum inductibility and of chemical protection against indirect effects.

3° The relation between the dose and the effect is exponential. With the small doses utilized in this study it is practically linear.

4° The reciprocity (dose-rate effect) has been observed within a range of 10^6 .

5° Induction is unaffected by temperature between 0° and 40°.

6° It is insensitive to the presence of oxygen.

7° A single photon suffices to produce induction with a probability which is a function of the dose. This allows to admit the validity of dose-effect relationship and of the reciprocity for all doses, however small these may be.

8° The practical use of induction as a biological means of measuring ionizing radiations is envisaged.

BIBLIOGRAPHIE

- [1] A. LWOFF et A. GUTMANN. *Ann. Inst. Pasteur*, 1950, **78**, 711.
- [2] A. LWOFF, L. SIMINOVITCH et N. KJELDGAARD. *Ann. Inst. Pasteur*, 1950, **79**, 815.
- [3] R. LATARJET. *Ann. Inst. Pasteur*, 1951, **81**, 389.
- [4] F. JACOB. *C. R. Acad. Sci.*, 1952, **234**, 2238.
- [5] H. MARCOVICH. *Ann. Inst. Pasteur*.
- [6] H. MARCOVICH. *Nature*, 1954, **174**, 796.
- [7] J. O'H. TOBIN. *Brit. J. exp. Path.*, 1953, **34**, 365.
- [8] A. HOLLAENDER, W. K. BAKER et E. M. ANDERSON. *Cold Spring Harbor Symp. on Quant. Biol.*, 1951, **16**, 315.
- [9] F. JACOB. *Ann. Inst. Pasteur*, 1952, **82**, 433.
- [10] W. P. SPENCER et C. STERN. *Genetics*, 1948, **33**, 43.
- [11] G. BONNIER et K. G. LÜNING. *Hereditas*, 1949, **35**, 163.

- [12] H. J. MÜLLER, I. H. HERSKOWITZ, S. ABRAHAMSON et I. I. OSTER. *Genetics*, 1954, **39**, 741.
- [13] L. H. GRAY. *Actions chimiques et biologiques des radiations*. 1955, 1-91, Masson et C^{ie}, édit.
- [14] O. E. LEA. *Action of radiations on living cells*. 1947, Cambridge University Press.
- [15] A. CHAPIRO. *Thèse Fac. Sci.*, Paris, 1950.
- [16] D. E. UPHOFF et C. STERN. *Science*, 1949, **109**, 609.
- [17] H. J. MÜLLER. *Radiation Biology*, 1954, 475. McGraw Hill, édit.
- [18] R. LATARJET. *Ann. Inst. Pasteur*, 1942, **68**, 561.
- [19] R. LATARJET. *C. R. Acad. Sci.*, 1944, **218**, 294.
- [20] W. MOPPETT. *Proc. Roy. Soc. Biol.*, 1930, **107**, 308.
- [21] H. LANGENDORF et K. SOMMERMEYER. *Strahlenth.*, 1940, **67**, 119.
- [22] H. MARCOVICH. *Bull. Acad. nat. Méd.*, 1955, n° 3, 80.

ANTITOXINE DIPHTÉRIQUE PURIFIÉE A PARTIR DU COMPLEXE ANTIGÈNE-ANTICORPS

II. — QUELQUES PROPRIÉTÉS PHYSICO-CHIMIQUES ET IMMUNOLOGIQUES

par F. YEU et D. PAVAGEAU (*).

(Institut Pasteur, Annexe de Garches)

Pour déterminer l'état de pureté de l'antitoxine diphtérique purifiée, que nous avons obtenue à partir du complexe toxine diphtérique brute et sérum antidiphtérique de cheval, nous avons effectué les tests physico-chimiques et immunologiques suivants.

I. — ELECTROPHORÈSE.

L'électrophorèse a été faite d'après la technique de Tiselius (1), dans les conditions suivantes : tampon véronal + ClNa, $\mu = 0,1$, pH 8,2. Les résultats, après deux heures, sont les suivants : les images montante et descendante présentent un pic sensiblement symétrique. En revanche, après quatre heures, l'image montante présente deux pics très voisins, alors que l'image descendante donne toujours un clocher symétrique (fig. 1).

II. — ELECTORRHÉOPHORÈSE SUR PAPIER.

Nous avons formé, par électrorhéophorèse sur papier (fig. 2), des complexes d'anatoxine diphtérique concentrée et partiellement purifiée avec :

1° Un immunosérum antidiphtérique purifié par les techniques usuelles ;

2° Notre sérum purifié à partir du complexe antigène-anticorps ;

3° Un sérum antidiphtérique brut.

(*) *Société Française de Microbiologie*, séance du 1^{er} décembre 1955. La première partie de ce travail, « Préparation », a paru dans les *Ann. Inst. Pasteur*, 1956, 90, 240.

(1) Nous adressons nos remerciements à M. Grabar, dans le service duquel a été effectuée cette électrophorèse.

Bien que les proportions d'antigène et d'anticorps mises en jeu aient été choisies pour répondre aux conditions optima de la neutralisation, il se forme en dehors de la tache qui correspond au complexe antigène-anticorps, une seconde tache dans l'aire des globulines γ . Ce fait montre qu'il existe des protéines de même mobilité que les globulines γ , mais qui ne sont pas des anticorps spécifiques. Cette seconde tache est moins importante avec le sérum antidiphtérique purifié par les méthodes habituelles

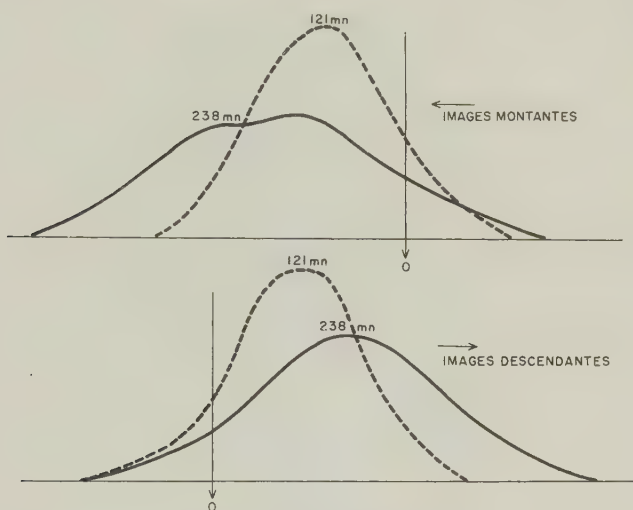


FIG. 1.

qu'avec le sérum brut. Elle est pratiquement inexistante lorsqu'on utilise comme antitoxine le sérum purifié à partir du complexe antigène-anticorps.

III. — ULTRACENTRIFUGATION (2).

L'image que nous avons obtenue après ultracentrifugation donne l'aspect d'un produit homogène (fig. 3). L'ultracentrifugation a été effectuée à une concentration de 4,5 p. 100 de protéine et à une vitesse de rotation de 59 780 tours/minute. Dans ces conditions, le produit étudié possède une vitesse de sédimentation de 3,8 unités Svedberg.

(2) Nous remercions M. Slizewicz qui a effectué cette ultracentrifugation au Service des Virus.

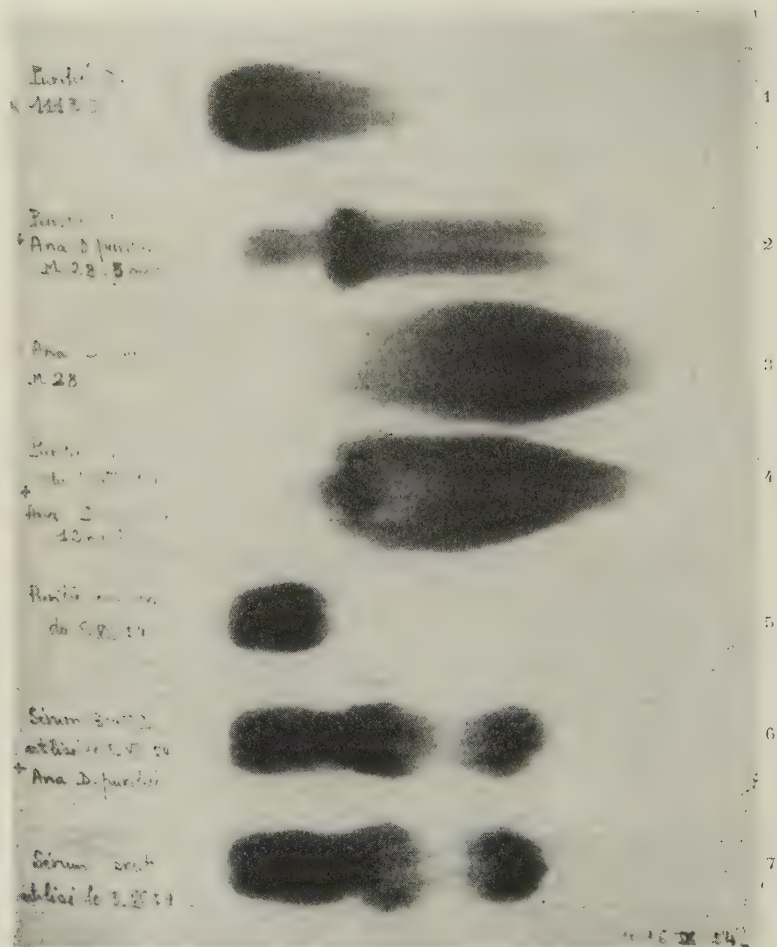


FIG. 2. — 1, sérum purifié par les techniques usuelles ; 2, complexe formé par le sérum purifié par les techniques usuelles et l'anatoxine diphtérique concentrée ; 3, anatoxine diphtérique concentrée ; 4, complexe formé par le sérum purifié à partir du complexe antigène-anticorps et l'anatoxine diphtérique concentrée ; 5, sérum purifié à partir du complexe antigène-anticorps ; 6, complexe formé par le sérum brut et l'anatoxine diphtérique concentrée ; 7, sérum antidiphtérique brut.

IV. — COURBE DE PRÉCIPITATION QUANTITATIVE
AVEC UN IMMUNSÉRUM DE LAPIN ANTI-SÉRUM DE CHEVAL (3).

Nous obtenons une courbe de précipitation régulière, avec une inhibition complète pour un faible excès d'antigène et une zone d'équivalence (fig. 4). Cette courbe correspondrait donc à celle d'un système homogène, c'est-à-dire un système ne comprenant qu'un antigène et l'anticorps homologue (4). La question se pose de savoir si la protéine qui précipite avec le sérum de lapin anti-sérum de cheval est bien la protéine anticorps. Afin d'élucider

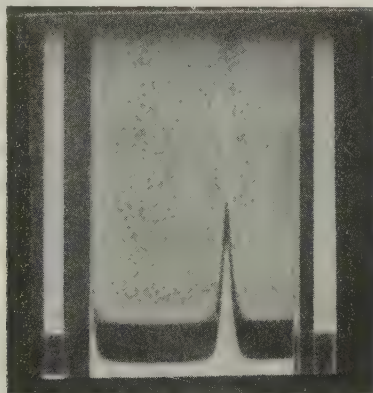


FIG. 3.

cette question, nous avons fait parallèlement les deux expériences suivantes :

1° A l'immunsérum de lapin épuisé par 12 Lf de notre antitoxine on ajoute 12 Lf de toxine diphtérique. Il ne se produit aucune floculation ;

2° A du sérum de lapin normal on ajoute 12 Lf de notre antitoxine et 12 Lf de toxine diphtérique. Un flocculat apparaît en quelques minutes à 37°.

L'absence de floculation dans la première expérience prouve que les 12 Lf d'antitoxine ont bien été entraînées par le sérum de lapin anti-sérum de cheval.

(3) Nous exprimons nos vifs remerciements à M. Perez qui nous a guidés et nous a permis d'effectuer ce travail.

(4) Toutefois, avec certains immunsérums de lapin, un léger ressaut de la courbe et une diminution de l'inhibition par excès d'antigène semblent indiquer la présence d'un second système précipitant peu important.

V. — DIFFUSION SIMPLE EN MILIEU GÉLIFIÉ (5).

Les réactifs employés étant l'antitoxine purifiée d'une part, et un immunosérum de lapin anti-sérum de cheval d'autre part, dans les conditions définies par Oudin, on observe (fig. 5) un anneau de précipitation net en (1) et un anneau à peine visible en (2) (6).

Le sérum antidiphthérique purifié à partir du complexe antigène-anticorps ne posséderait, par conséquent, qu'un antigène

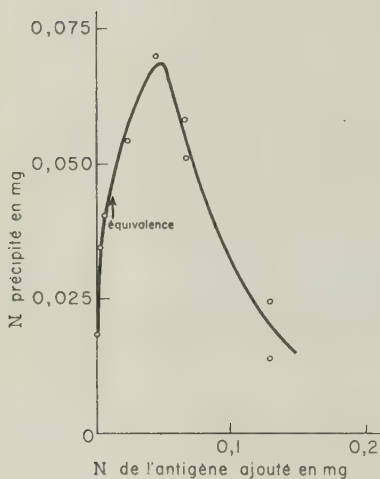


FIG. 4.

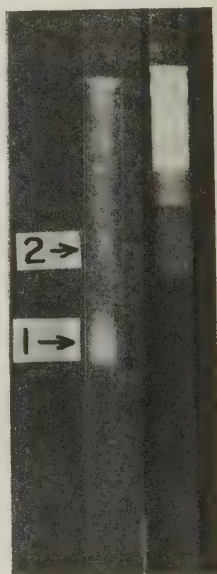


FIG. 5.

en quantité importante. Au contraire, le sérum normal de cheval contient plusieurs antigènes décelables par la méthode de Oudin.

VI. — DIFFUSION DOUBLE EN MILIEU GÉLIFIÉ.

D'après la technique d'Ouchterlony, nous avons étudié les réactions de précipitation entre une anatoxine partiellement purifiée (A) d'une part, et un sérum brut (B), un sérum purifié

(5) Nous exprimons tous nos remerciements à M. Oudin qui a bien voulu effectuer cette réaction.

(6) Ce second anneau n'apparaît qu'avec certains immunosérums de lapin.

par la méthode habituelle (P), et notre sérum purifié à partir du complexe antigène-anticorps (C), d'autre part (fig. 6). Une série de zones de précipitation apparaît entre (A) et (B) ; ces zones sont moins nombreuses entre (A) et (P) ; nous n'en obser-

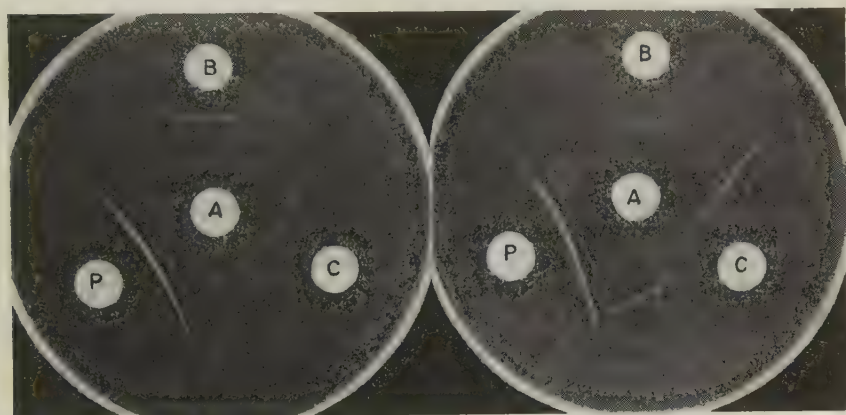


FIG. 6.

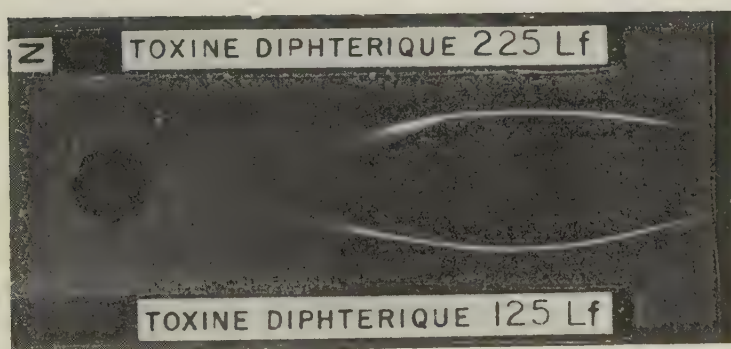


FIG. 7.

vons plus que deux entre (A) et (C). Une de ces zones est beaucoup plus importante que l'autre. Si nous prolongeons la durée de la réaction (2^e photo), elle rejoint une des zones de précipitation apparues entre (A) et (P) et semble correspondre à l'anneau de précipitation (1) décelé par la méthode de Oudin.

VII. — IMMUNO-ÉLECTROPHORÈSE (7).

L'image obtenue par immuno-électrophorèse (fig. 7) effectuée avec notre antitoxine purifiée et une toxine diphtérique brute est celle d'un anticorps voisin de la pureté ; tout au plus décèle-t-on dans notre préparation une trace d'un autre anticorps révélé par l'apparition d'une seconde zone de précipitation à peine visible.

RÉSUMÉ.

Par différentes méthodes physico-chimiques et immunologiques, nous avons constaté que l'anticorps obtenu par dissociation du complexe toxine-antitoxine diphtériques est voisin de la pureté. Toutes les réactions dont nous avons exposé les résultats montrent d'une façon évidente que ce produit purifié est formé de deux composants dont l'un est en quantité importante et l'autre à l'état de traces.

SUMMARY.

By different physico-chemical and immunological methods, the authors have established that the antibodies obtained by the dissociation of the diphtheria toxin-antitoxin complex are proximate to purity. All the reactions, the results of which the authors have set out, demonstrate plainly that the purified product is formed of two components one present in an appreciable quantity and the other as a trace.

(7) Nous remercions M. Relyveld qui a effectué cette immuno-électrophorèse.

SOCIÉTÉ FRANÇAISE DE MICROBIOLOGIE

(*Institut Pasteur, 25, rue du Docteur-Roux, Paris, 15^e.*)

Séance du 2 Février 1956.

Présidence de M. PRÉVOT.

COMMUNICATIONS

CONTRIBUTION A L'ÉTUDE DE LA FLORE INTESTINALE AÉROBIE DU NOURRISSON ET DU JEUNE ENFANT

par G. MOUSTARDIER, J. BENTEGEAT et P. LE NOC.

(*Laboratoire de Biologie de l'Hôpital Saint-André (*)*
et Laboratoire de Microbiologie de la Faculté de Médecine de Bordeaux)

Nous apportons les résultats d'une étude, relatée par l'un de nous [6] dans sa thèse, qui a comporté un certain nombre de coprocultures pratiquées chez des enfants âgés de 3 semaines à 18 mois, alimentés d'abord au biberon, puis recevant une alimentation mixte, lacto-végétarienne.

Ces coprocultures ont été effectuées chez plusieurs groupes d'enfants :

a) Enfants entrés à l'hôpital pour affections diverses ne touchant pas le tube digestif ;

b) Enfants d'une pouponnière de l'Assistance Publique avant tout traitement ;

c) Enfants vivant en milieu familial avant tout traitement ;

d) Enfants sains, n'ayant jamais reçu de traitement, vivant en milieu hospitalier, en milieu familial ou en collectivité.

Nous avons d'abord pratiqué une étude de la répartition de la flore intestinale et de sa prédominance par l'examen microscopique d'épandages, séchés, fixés et colorés par le Gram, de selles fraîches, diluées

(*) Nous remercions le Dr Servantie d'avoir permis la réalisation de cette étude dans son laboratoire

dans un peu de sérum physiologique, qui nous a donné une certaine valeur d'orientation.

Nous avons ensuite pratiqué, pour chaque selle fraîchement émise et diluée dans du sérum physiologique, des ensemencements sur différents milieux de culture, coulés en boîte de Petri, en vue de l'isolement des principaux germes aérobies intestinaux.

L'isolement des entérobactéries a été pratiqué sur milieu E. M. B., sur gélose au vert brillant de Kristensen, modifiée par Kauffmann, et sur milieu S. S. L'isolement des staphylocoques a été réalisé sur milieu mannité de Chapman, celui des pyocyaniques sur gélose ordinaire et sur sérum coagulé, celui des entérocoques sur gélose ordinaire ou enrichie avec de l'ascite, et celui des levures sur le milieu glucosé de Sabouraud.

I. RÉPARTITION DE LA FLORE INTESTINALE. — Dans l'ensemble, après coloration par le Gram, l'examen microscopique des frottis de selles de ces différents enfants a montré une flore abondante et panachée avec tantôt une légère prédominance de la flore Gram négative, tantôt une légère prédominance de la flore Gram positive. On ne constate de nette prédominance de l'une ou de l'autre flore que dans les cas pathologiques.

Suivant l'alimentation, on ne note pas de différences notables.

Sur 35 enfants nourris au biberon, 25 avaient une flore intestinale à prédominance Gram négative, les bacilles Gram négatifs étant beaucoup plus nombreux sur les frottis que les bacilles et les cocci Gram positifs.

Sur 76 enfants ayant une alimentation mixte, variée, 74 montraient une nette prédominance de la flore Gram négative, avec 60 à 80 p. 100 de bacilles Gram négatifs pour 20 à 40 p. 100 de bacilles ou de cocci Gram positifs.

Cette prédominance de la flore Gram négative est d'autant plus nette que l'on s'adresse à des enfants séjournant à l'hôpital ou dans une collectivité, par suite de la présence surajoutée dans leurs selles d'une quantité importante de *Proteus* ou de pyocyaniques, comme le démontrent les coprocultures systématiques.

Voici 3 exemples de répartition de flore intestinale chez 3 enfants vivant dans des conditions différentes :

Lag... (hôpital), 8 mois. Bacilles Gram +, 15 p. 100 ; bacilles Gram —, 70 p. 100 ; cocci Gram +, 15 p. 100. Flore à nette prédominance rouge.

Presc... (collectivité), 1 an. Bacilles Gram +, 20 p. 100 ; bacilles Gram —, 60 p. 100 ; cocci Gram +, 20 p. 100. Flore à prédominance rouge.

M. J... (extérieur), 13 mois. Bacilles Gram +, 30 p. 100 ; bacilles Gram —, 60 p. 100 ; cocci Gram +, 10 p. 100. Flore à prédominance rouge.

II. RÉSULTATS DES COPROCULTURES. — 1° *Isolement des entérobactéries.* — Sur 116 coprocultures pratiquées nous avons isolé :

a) *Dans le groupe des coliformes.* — *Escherichia coli* dans 106 coprocultures, c'est le germe le plus habituel, qui pousse très facilement même sur les milieux usuels et qui occupe une large surface de l'isolement (7 à 9/10).

Escherichia intermedium dans 37 coprocultures.

Aerobacter aerogenes dans 34 coprocultures.

Paracoli aerogenes et *intermedium* dans 25 coprocultures.

Paracoli aerobacter et *escherichia* dans 20 coprocultures.

Klebsiella pneumoniae dans 3 coprocultures seulement.

Ces différents germes n'occupent qu'une faible partie de l'isolement (1 à 3/10).

Dans 3 cas nous avons isolé une souche de colibacille des gastro-entérites infantiles : 1 souche de 111 B₁ et 2 souches de 26 B₂. A noter que ces 3 enfants ne présentaient aucune manifestation clinique.

b) Dans le groupe « *Providencia* ». — Les germes de ce genre ont été isolés dans 5 coprocultures.

c) Dans le groupe « *Proteus* ». — Nous avons isolé des germes du genre *Proteus* dans 56 coprocultures avec la répartition suivante des espèces :

25 souches de *Proteus vulgaris*.

21 souches de *Proteus mirabilis*.

10 souches de *Proteus rettgeri*.

En ce qui concerne les entérobactéries, on trouve dans une même coproculture la présence quasi constante d'*Escherichia coli*, une grande fréquence des *Proteus* et une répartition assez variable des autres coliformes avec, par ordre de fréquence, *Escherichia intermedium*, *Aerobacter aerogenes* et les *paracoli*.

2° Isolement des staphylocoques. — Dans 94 p. 100 des coprocultures, nous avons isolé des staphylocoques à critère pathogène (mannitol + staphylocoagulase et hémolysine positives).

3° Isolement des pyocyaniques. — Nous avons isolé *Pseudomonas aeruginosa* dans 14 coprocultures.

4° Isolement des entérocoques. — Ces germes sont extrêmement abondants dans les selles du nourrisson et du jeune enfant, puisqu'on a isolé *Streptococcus faecalis* dans 101 coprocultures, où il représente 15 à 30 p. 100 environ de la flore aérobie.

5° Isolement des levures. — Sur 116 coprocultures effectuées sur le milieu de Sabouraud, on a isolé 40 fois des levures du type *Candida albicans*.

III. — VARIATIONS DE LA FLORE INTESTINALE SUIVANT LES LIEUX DE PRÉLÈVEMENT. — On constate des variations très nettes de la flore intestinale suivant que les prélèvements ont été effectués chez des enfants vivant en milieu hospitalier, en collectivité ou en milieu familial.

1° Entérobactéries. — a) L'isolement des différents coliformes est à peu près le même quel que soit l'origine du prélèvement, sauf en ce qui concerne les colibacilles des gastro-entérites infantiles qui n'ont été trouvés que dans les selles d'enfants hospitalisés.

b) L'isolement des *Proteus* est beaucoup plus fréquent dans les prélèvements effectués chez des enfants vivant en collectivité. Alors que l'on ne trouve des *Proteus* que dans 30 p. 100 des selles des enfants vivant en milieu familial, on les isole dans 67 p. 100 des selles des enfants vivant en collectivité saine et dans 57 p. 100 des selles d'enfants hospitalisés dans différents services.

2° Pyocyaniques. — *Pseudomonas aeruginosa* n'a été rencontré que dans les selles d'enfants séjournant depuis un certain temps à l'hôpital ou dans une collectivité.

3° *Staphylocoques*. — Les variations sont ici également très nettes.

a) *En milieu hospitalier*, sur 80 enfants, 75 avaient des staphylocoques à critère pathogène dans leurs selles, soit 93 p. 100.

b) *En collectivité saine*, sur 26 enfants, 20 étaient porteurs de staphylocoques à critère pathogène dans leurs selles, soit 76 p. 100.

c) *En milieu familial*, sur 10 enfants, on ne trouve des staphylocoques à critère pathogène que dans les selles de 5 d'entre eux, soit 50 p. 100.

IV. — COMPARAISON AVEC LES RÉSULTATS D'AUTRES AUTEURS. — La flore intestinale normale du nourrisson et du jeune enfant a été étudiée par de nombreux auteurs. Bien que notre étude ait été limitée à la flore aérobie, nous pouvons, cependant, la comparer à quelques études récentes pratiquées chez le nourrisson et le jeune enfant.

Il faut cependant noter que les données classiques intéressent surtout la flore intestinale normale d'enfants vivant en milieu familial et qu'elle est liée au mode d'alimentation (lait maternel, autres laits, alimentation mixte) de ces enfants.

Lorsqu'un enfant vit en collectivité ou en milieu hospitalier, on constate toujours une flore supplémentaire de contamination, constituée en majeure partie par des staphylocoques, des *Proteus* et des pyocyaniques.

Tous les auteurs sont d'accord sur la présence dans les selles de nourrissons au sein, dès les premiers jours après la naissance, d'une quantité importante (90 p. 100) de *Bifidobacterium bifidum* associé à 10 p. 100 de germes variés (coliformes, entérocoques).

Digeon et Raynaud [3] ont insisté sur la fréquence de ce germe, sur la présence quasi constante de *Micrococcus niger* et sur l'absence de germes anaérobies pathogènes.

Chez l'enfant nourri au biberon, la flore intestinale est remaniée et le taux des germes aérobies augmente, en particulier celui des coliformes et des entérocoques.

Chez l'enfant ayant une alimentation mixte, on voit se surajouter à la flore précédente, une flore anaérobie variée (cocci, bacilles) et cette flore, à prédominance rouge, tend à devenir semblable à celle de l'adulte.

Butiaux et Pierret [4] constatent la présence de staphylocoques dans 80 p. 100 des selles de nourrissons normaux dès les premiers jours de la vie.

Cette présence quasi constante de staphylocoques dans les selles d'enfants, qui varie suivant les lieux de prélèvement, avait été constatée antérieurement à Bordeaux par Estrade [5] qui donnait les chiffres suivants :

En collectivité, sur 72 prélèvements, 96 p. 100 des nourrissons étaient porteurs de staphylocoques à critère pathogène.

À l'hôpital, sur 422 prélèvements, 90,7 p. 100 des nourrissons étaient porteurs de staphylocoques, dont 80,3 p. 100, à critère pathogène.

Chez des enfants sains, vivant en milieu familial, sur 17 prélèvements, 57,8 p. 100 étaient porteurs de staphylocoques à critère pathogène.

Nos constatations, bien que faites sur une moins grande échelle,

mais dans les mêmes groupes d'enfants, se rapprochent de celles faites par cet auteur en 1954.

En ce qui concerne les *Proteus*, que nous avons trouvés dans 48 p. 100 de nos coprocultures effectuées chez les enfants vivant surtout en collectivité, nos constatations diffèrent de celles faites par Clément et Fontanille [2], qui ne trouvent que 20 p. 100 des selles contenant du *Proteus* chez des enfants présentant des diarrhées, et de celles de Lévesque et Coffin [7], qui ont identifié 31 fois ce germe sur 280 coprocultures, soit dans 11 p. 100 des selles.

Les pyocyaniques, que l'on ne trouve que dans les selles d'enfants vivant à l'hôpital ou en collectivité, ont été également trouvés par d'autres auteurs et peuvent, même, être à l'origine d'épidémies chez les nourrissons, comme celle qui a été relatée par Durand [4] en 1954.

RÉSUMÉ ET CONCLUSIONS. — Une étude de la flore intestinale aérobie du nourrisson et du jeune enfant a montré qu'elle était abondante et panachée, avec une légère prédominance de la flore Gram négative, et constituée par des coliformes, des *Proteus*, des staphylocoques, des entérocoques, des bacilles pyocyaniques et des levures.

Cette étude a révélé, en outre, qu'il existait des variations importantes de cette flore suivant les lieux de prélèvement, surtout en ce qui concerne les staphylocoques, les *Proteus* et les pyocyaniques, qui sont beaucoup plus abondants dans les selles d'enfants hospitalisés ou vivant en collectivité.

Nos constatations sont en accord avec celles faites récemment par d'autres auteurs, surtout en ce qui concerne la présence de staphylocoques à critère pathogène dans les selles de nourrissons ou de jeunes enfants normaux.

BIBLIOGRAPHIE

- [1] R. BUTTIAUX et J. PIERRET. *Ann. Inst. Pasteur*, 1949, **76**, 480.
- [2] R. CLÉMENT et C. FONTANILLE. *Presse médicale*, 1952, **60**, 1323.
- [3] M. DIGEON et M. RAYNAUD. *Ann. Inst. Pasteur*, 1952, **82**, 362.
- [4] B. DURAND. *Thèse Médecine*, Bordeaux, 1954, n° 267.
- [5] G. ESTRADÉ. *Thèse Médecine*, Bordeaux, 1954, n° 94.
- [6] P. LE NOC. *Thèse Médecine*, Bordeaux, 1955, n° 227.
- [7] J. LEVESQUE et C. COFFIN. *Le Nourrisson*, 1951, **39**, 79

**ÉTUDE DES MODIFICATIONS
DE LA FLORE INTESTINALE AÉROBIE
DU NOURRISSON ET DU JEUNE ENFANT
SOUS L'INFLUENCE DES ANTIBIOTIQUES (*).**

par G. MOUSTARDIER, J. BENTEGEAT et J. LE NOC.

*(Laboratoire de Biologie de l'Hôpital Saint-André et Laboratoire
de Microbiologie de la Faculté de Médecine de Bordeaux)*

RÉSUMÉ ET CONCLUSIONS. — L'étude de la flore intestinale aérobie du nourrisson et du jeune enfant après traitement par les antibiotiques, montre, pour chaque antibiotique considéré, des modifications globales et des coprocultures propres à chacun d'eux.

La pénicilline n'a aucune action sur la flore Gram négative et une action très faible sur la flore Gram positive.

La streptomycine n'apporte des modifications importantes qu'après des traitements de longue durée. La flore devient à prédominance bleue et la coproculture montre une diminution fréquente des coliformes, l'augmentation possible du *Proteus* et l'apparition parfois de pyocyaniques et de staphylocoques dorés.

Le chloramphénicol a sensiblement la même action que la streptomycine, aussi bien dans les traitements de courte que de longue durée, mais son action destructive sur les coliformes est nettement plus accusée après de longs traitements.

Les tétracyclines touchent inégalement les deux flores : la flore rouge, par suite de la sensibilité des entérobactéries à ce groupe, diminue, alors que la flore bleue, généralement résistante, prolifère à la faveur de ce déséquilibre.

L'oxytétracycline a l'action la plus forte sur la flore intestinale et la tétracycline, à action moindre, semble la mieux tolérée.

L'érythromycine n'a d'action que sur la flore bleue, alors que la flore rouge reste inchangée.

La néomycine, très efficace sur les germes Gram négatifs, fait disparaître tous les coliformes des coprocultures, mais n'a que peu d'action sur les entérocoques, habituellement résistants.

L'association pénicilline + streptomycine est beaucoup moins active sur la flore intestinale que la streptomycine seule, et on observe les modifications les plus importantes après quarante-huit heures de traitement.

On observe fréquemment, après les traitements par les antibiotiques

(*) Ce mémoire paraîtra *in extenso* dans un prochain numéro des *Annales de l'Institut Pasteur*.

polyvalents, de très nombreuses levures du type *Candida albicans* dans les selles des enfants traités.

Dans tous nos cas, malgré les modifications parfois importantes de la flore intestinale de ces enfants, nous n'avons jamais constaté, à part quelques épisodes diarrhéiques légers, d'accidents cliniques graves.

LES MODIFICATIONS DE LA FLORE INTESTINALE AÉROBIE DU NOURRISSON ET DU JEUNE ENFANT APRÈS TRAITEMENT PAR LES ANTIBIOTIQUES ASSOCIÉS A DES PRÉPARATIONS DE LEVURES, DE FERMENTS LACTIQUES ET DE VITAMINES B

par G. MOUSTARDIER, J. BENTEGEAT et P. LE NOC.

(Laboratoire de Biologie de l'Hôpital Saint-André et Laboratoire
de Microbiologie de la Faculté de Médecine de Bordeaux)

Les modifications de la flore intestinale après traitement par les substances antibiotiques, que nous avons étudiées dans une précédente note [3], sont susceptibles parfois de provoquer des accidents digestifs plus ou moins graves, qui peuvent être dus soit à la pullulation d'une flore résistante, existant normalement dans le tube digestif, ou d'une flore substitutive pathogène, soit à une avitaminose.

Le remplacement des germes normaux de l'intestin par de nouveaux micro-organismes, staphylocoques, *Proteus* ou même levures, qui n'ont aucun pouvoir de synthèse vitaminique, peut, en effet, engendrer secondairement une avitaminose.

Comme le fait remarquer justement Debruge [2] dans sa thèse, les bactéries intestinales jouent un rôle indiscutable, peut-être quantitativement faible, dans la vitamino-synthèse, et il semble bien que les antibiotiques, par leur action destructive ou bouleversante de ces bactéries, puissent créer des avitaminoses, mais, cependant, les opinions et les expériences sont encore, sur ce point, très divergentes. Pour combattre les accidents dus aux antibiotiques, on a préconisé d'associer à l'antibiothérapie soit des préparations à base de levures ou de ferments lactiques en suspension, apportant une flore substitutive, soit des vitamines du groupe B, suppléant aux déficiences vitaminiques intestinales.

Ayant eu l'occasion d'observer quelques cas où ces diverses préparations ont été données aux enfants en association avec les antibiotiques, nous avons étudié les modifications de la flore intestinale aérobie après ce traitement.

Ces préparations ont été utilisées au cours de traitements par des

antibiotiques polyvalents (streptomycine, chloramphénicol, groupe des tétracyclines). Dans 5 cas, on a utilisé des préparations à base de levures, dans 5 autres des ferments lactiques en suspension et, dans les 5 derniers, des vitamines du groupe B.

1° ASSOCIATION AUX ANTIBIOTIQUES DE PRÉPARATIONS A BASE DE LEVURES.

— Dans nos 5 observations, elles furent utilisées 3 fois en association avec un traitement par le chloramphénicol et 2 fois avec un traitement par la terramycine.

Dans 5 cas, nous avons trouvé à l'examen direct des selles, après traitement, une pullulation de levures, donnant une flore bleue caractéristique et formant la majeure partie de cette flore. Si cette flore de substitution évite un trop grand appauvrissement du milieu microbien intestinal provoqué par l'antibiotique, elle n'empêche pas l'action spécifique de chaque antibiotique sur la flore intestinale normale.

a) *Dans les traitements au chloramphénicol*, l'étude de la flore montrait cette réduction des germes Gram positifs et Gram négatifs, avec un taux plus important de germes Gram positifs que dans les selles normales. Les cocci, surtout, étaient augmentés, car l'antibiotique avait détruit une grande partie des bacilles Gram positifs. Dans la coproculture, il y avait modification du rapport quantitatif des germes, réduction d'*Escherichia coli* au profit d'un *Proteus* ou d'un *paracoli*. L'isolement des staphylocoques s'est montré plus riche à la seconde coproculture qu'à la première.

b) *Dans les traitements à la terramycine*, un de nos deux cas avait conservé une flore rouge assez abondante, mais l'autre présentait une flore bleue, surtout entérococcique et staphylococcique. Dans la coproculture, on constatait, dans un cas, la disparition de *Paracoli aerogenes* et, dans l'autre, celle d'*Escherichia intermedium*. Nous n'avons pas observé l'augmentation du taux des *Proteus*, ni l'apparition d'autres germes.

2° ASSOCIATION AUX ANTIBIOTIQUES DE FERMENTS LACTIQUES EN SUSPENSION.

— Ils ont été utilisés dans cinq cas, chez trois enfants traités au chloramphénicol et chez deux enfants traités à l'auréomycine, pendant une durée de huit à douze jours.

L'examen direct des selles montrait la pullulation de bacilles Gram positifs, donnant toujours à la flore une prédominance bleue, mais, ici aussi, cette flore substitutive n'empêche pas les modifications de la flore intestinale normale.

a) *Dans les traitements au chloramphénicol*, nous avons retrouvé les mêmes modifications qui accompagnent ces traitements : diminution des germes Gram négatifs, augmentation du taux des germes Gram positifs par rapport au taux normal des selles, surtout des entérocoques et des staphylocoques. Dans la coproculture, on observe, parfois, sur les milieux usuels quelques maigres colonies de ces germes substitutifs.

b) *Dans les traitements à l'auréomycine*, on a constaté dans un cas la disparition d'*Escherichia coli*, qui ne s'accompagnait pas de la prolifération d'un germe plus résistant.

3° ASSOCIATION AUX ANTIBIOTIQUES DES VITAMINES DU GROUPE B. — Dans deux cas, elles étaient associées à un long traitement par la streptomycine, dans deux autres à un traitement par le chloramphénicol et, dans un dernier cas, à un traitement par la terramycine.

a) *Dans les traitements à la streptomycine et à la terramycine*, les vitamines avaient été données après un certain temps de traitement et les perturbations de la flore intestinale, qui avaient eu le temps de s'établir, n'ont pas été modifiées par l'apport supplémentaire de vitamines.

b) *Dans les traitements au chloramphénicol*, l'association vitaminique avait été utilisée dès le début du traitement. A l'examen direct, la flore intestinale était appauvrie, mais restait, cependant, à prédominance rouge et, dans la coproculture, on ne constatait pas de modifications sensibles dans le rapport quantitatif des germes, ni de disparition d'espèces.

Voici un exemple : Denis Pomm..., douze jours de tifomycine + vitamines B.

Avant traitement : *E. coli*, 6/10 ; *P. intermedium*, 2/10 ; *P. rettgeri*, 1/10 ; Entérocoques, 1/10 ; Staphylocoques +.

Après traitement : *E. coli*, 5/10 ; *P. intermedium*, 2/10 ; *P. rettgeri*, 1/10 ; Entérocoques, 2/10 ; Staphylocoques, ++.

4° CONCLUSIONS. — Bien que le nombre des observations soit très restreint, on peut, cependant, en tirer quelques conclusions.

Les deux premières thérapeutiques d'association (levures et ferments lactiques) n'apportent qu'une flore de substitution, en même temps source possible de vitamines, mais n'empêchent nullement les modifications de la flore intestinale par l'antibiotique. Elles jouent peut-être un rôle favorable en limitant la pullulation d'une entérobactérie ou d'un coccus résistant à l'antibiotique donné.

Le groupe des vitamines B semble jouer un rôle plus favorable, en freinant le mécanisme des sélections en chaîne, que Brisou [4] a imaginé pour expliquer la pathogénie des accidents de l'antibiothérapie, dus à la destruction des germes sensibles à l'antibiotique, puis de celle des bactéries qui, malgré leur insensibilité à l'antibiotique, ne supportent pas les carences vitaminiques.

L'association des vitamines B à l'antibiotique permettrait la conservation de l'équilibre bactérien du tractus digestif, si souvent modifié au cours des traitements antibiotiques.

Ces quelques réflexions ne résolvent certes pas le problème, car on peut, en effet, se demander, dans le cas où l'association antibiotique et vitamines n'a apporté aucune modification dans la flore intestinale, si cette flore ne serait pas restée identique avec l'antibiotique seul, car il nous est fréquemment arrivé de n'avoir aucune modification de la flore intestinale de nos enfants après traitement par l'antibiotique utilisé seul.

Il serait donc intéressant d'approfondir cette question en comparant, sur un très grand nombre de cas, ces diverses préparations, en particulier le groupe des vitamines B.

On peut toutefois recommander, du point de vue clinique, d'associer ces thérapeutiques, substitutive ou vitaminique, aux antibiotiques

polyvalents qui font disparaître un très grand nombre de germes intestinaux, en particulier la néomycine dont l'action destructrice est très marquée. En ce qui concerne l'association de vitamines du groupe B, en particulier, il y a intérêt à la mettre en œuvre dès le début du traitement antibiotique, pour essayer d'éviter l'apparition du mécanisme des sélections en chaîne.

BIBLIOGRAPHIE

- [1] J. BRISOU. *Presse médicale*, 1953, **64**, 748.
- [2] J. DEBRUGE. *Thèse Médecine*, Bordeaux, 1955, n° 152.
- [3] G. MOUSTARDIER, J. BENTEGEAT et P. LE NOC. *Ann. Inst. Pasteur* (sous presse).

ÉLÉMENTS D'ENQUÊTE SÉROLOGIQUE SUR L'INFECTION DU BÉTAIL FRANÇAIS PAR *VIBRIO FÆTUS*

par H. JACOTOT et A. VALLÉE

(avec la collaboration technique de A. LE PRIOL.)

(*Institut Pasteur, Service de Microbiologie Animale*)

La détection sérologique de la vibriose par agglutination de l'antigène spécifique est un procédé facile et simple dans son principe, mais dont l'application se heurte à quelques difficultés ; assez rares, en effet, sont les sérums de vaches infectées qui soient fortement agglutinants à des dilutions élevées ; inversement, nombreuses sont les femelles dont le sérum agglutine aux dilutions faibles et qui, vraisemblablement, ne sont pas toutes infectées.

Expérimentalement l'on peut obtenir en une dizaine de jours un bon sérum agglutinant en pratiquant des inoculations successives de culture du vibriion. On trouvera dans le tableau I quelques indications précises sur ce point. Les résultats que nous y avons réunis concernent une brebis, une chèvre et un lapin ; ces animaux ont reçu, chaque fois, par voie veineuse, des cultures en bouillon additionné d'extrait de viande (culots de centrifugation repris en eau physiologique) de *V. fætus* AMD aux doses progressives de 5, 10 et 20 ml pour la chèvre et la brebis, de 2, 5 et 10 ml pour le lapin, et par voie musculaire, des cultures du même germe en bouillon gélosé, à la dose de 20 ml pour la brebis et la chèvre et de 10 ml pour le lapin. Les inoculations étaient pratiquées 2 fois par semaine, chacune d'elles étant précédée d'une prise de sang. La première inoculation de germes a été faite le 8 avril, la 1^{re} prise de sang après inoculation a été faite le 12 avril et la 7^e le 5 mai.

Les taux enregistrés (++++) au 1/8 000, au 1/30 000 et au 1/60 000) contrastent avec ceux qu'accusent les sérums des vaches infectées de vibriose. Nos observations portent sur 6 vaches chez lesquelles *Vibrio*

fætus a été isolé à l'occasion d'un avortement. Dans les jours précédant ou suivant l'avortement, et ce jour même, nous n'avons pas relevé de titre agglutinant (+ + + +) supérieur à 480 ; chez l'une des vaches il était de 120 le jour de l'avortement ; chez 2 autres de 240 quelques jours après. Chez une vache il est passé de 240 quelques jours après l'avortement à 960 huit mois plus tard.

TABLEAU I.

Prises de sang successives		Titres des sérums en présence de l'antigène homologue											
		30	60	120	240	480	960	1920	3840	7680	15360	30720	61440
CHEVRE 169	Avant la 1ère inoculation	++++	++++	++++	+++	+	0						
	Après la 1ère inoculation	++++	++++	++++	++++	++++	+	+	0				
	" 2ème "	++++	++++	++++	++++	++++	++++	++++	++++	++			
	" 3ème "	++++	++++	++++	++++	++++	++++	++++	++++	0			
	" 4ème "	++++	++++	++++	++++	++++	++++	++++	++++	++++	+++	++	+
	" 5ème "	++++	++++	++++	++++	++++	++++	++++	++++	++++	++++	++++	++
	" 6ème "	++++	++++	++++	++++	++++	++++	++++	++++	++++	++++	++++	+++
BREVIS 179	Avant la 1ère inoculation	++++	+++	++	0								
	Après la 1ère inoculation	++++	++++	++++	+++	+	0						
	" 2ème "	++++	++++	++++	++++	++++	++++	+++	++	+	0		
	" 3ème "	++++	++++	++++	++++	++++	++++	++++	++++	++	++	+	0
	" 4ème "	++++	++++	++++	++++	++++	++++	++++	++++	++	0	0	
	" 5ème "	++++	++++	++++	++++	++++	++++	++++	++++	++	0	0	
	" 6ème "	++++	++++	++++	++++	++++	++++	++++	++++	++	++	++	+
LAPIN 63	Avant la 1ère inoculation	++	+	0									
	Après la 1ère inoculation	++++	++++	++++	++++	+++	++	+	0				
	" 2ème "	++++	++++	++++	++++	++++	++++	++++	++++	+++	++	0	
	" 3ème "	++++	++++	++++	++++	++++	++++	++++	++++	++++	+++	++	+
	" 4ème "	++++	++++	++++	++++	++++	++++	++++	++++	++++	++++	++++	+++
	" 5ème "	++++	++++	++++	++++	++++	++++	++++	++++	++++	++++	++++	+++
	" 6ème "	++++	++++	++++	++++	++++	++++	++++	++++	++++	++++	++++	+++

La présence, dans le sérum d'un grand nombre de vaches vraisemblablement indemnes, d'une certaine quantité d'agglutinines peut s'expliquer par l'action d'éléments microbiens possédant avec *Vibrio fætus* un agglutinogène commun. La structure de *V. fætus* est si complexe et si diverse, J. Gallut l'a bien montré [1], qu'une telle interprétation serait plausible. Mais on peut se demander si des fractions antigéniques d'origine plus banale ne sont pas aptes à susciter l'élaboration d'anticorps agglutinants vis-à-vis des corps microbiens tués de *Vibrio fætus*. Une autre hypothèse serait que *Vibrio fætus* lui-même fût plus communément présent dans le milieu extérieur qu'on n'en pense d'ordinaire. Nous avons rassemblé dans le tableau II les résultats des éprouvettes d'agglutination que nous avons effectuées avec les sérums d'animaux dont un grand nombre (chiens, chevaux hongres, mulets, bœufs) n'apparaissaient pas comme ayant dû être particulièrement exposés à l'infection vibronienne (1).

Tenant compte de ces constatations, nous avons adopté comme

(1) Nous remercions vivement, ici, nos collègues de l'Institut Pasteur, à Paris et à Garches, ainsi que le vétérinaire capitaine R. Illartain, auxquels nous devons d'avoir pu disposer des sérums de ces divers animaux.

règle d'attacher la présomption d'infection aux réactions entraînant éclaircissement total avec culot bien constitué (++++) à la dilution du 1/480 au moins, et seulement la suspicion d'infection aux réactions de même intensité à la dilution du 1/240.

TABLEAU II.

Animaux examinés		Dénombrement selon la plus forte dilution donnant ++++						
		0	1/30	1/60	1/120	1/240	1/480	1/960
<u>Chiens</u>	<u>Chiens de particuliers</u>							
	14 mâles	2	2	6	2	1		1
	11 femelles	1	2	5	1	2		
	<u>Chiens des chenils militaires</u>							
	12 mâles	7	4		1			
<u>Equidés</u>	<u>Chevaux</u>							
	9		1		2	3	2	1
	<u>Juments</u>							
	6				1	4	1	
	<u>Mulets</u>							
	7				2	4	1	
<u>Bovidés</u>	<u>Boeufs castrés</u>							
	25		2	4	7	12		
	<u>Vaches et génisses hors d'élevage</u>							
	63		5	9	28	16	4	1

Nous avons ainsi testé près d'un millier d'échantillons de sérum de bovidés, vaches surtout et taureaux (34) en provenance de 16 départements. Il convient de préciser ici que ces examens nous ont été demandés par des vétérinaires qui soupçonnaient l'existence de la vibriose chez les animaux considérés.

Nous avons fait usage d'un antigène préparé avec la souche AMD et contenant 800 millions de corps microbiens tués par ml.

En même temps que la séro-agglutination vibrionienne nous pratiquions la séro-agglutination avec antigène brucellique ; et, suivant la convention fixée par la réglementation officielle en France, nous avons affecté de positivité les sérums de vaches et de taureaux donnant une agglutination totale (++++) à la dilution de 1/40 au moins.

Les résultats de la double épreuve ont été groupés dans le tableau III.

De ce tableau nous pouvons dégager quelques notions précises : les 16 départements énumérés, diversement répartis sur le territoire sont, la plupart certainement, quelques-uns très probablement, infectés de vibriose. On peut considérer que, dans l'ensemble des animaux examinés, la proportion de sujets certainement atteints de vibriose est d'environ 20 p. 100 ; cette proportion s'élève à 45 p. 100,

au moins, lorsqu'on y incorpore les suspects d'infection. Ces suspects compris, plus de 35 p. 100 des animaux seraient atteints de vibriose, seule ou associée à la brucellose, alors que moins de 30 p. 100 seraient atteints de brucellose, seule ou associée à la vibriose. Ces chiffres, pour approximatifs qu'ils soient, donnent à penser que l'infection vibrionienne occupe en France, dans la pathologie bovine, une place qu'on ne saurait négliger. Et ceci vient à l'appui des conclusions auxquelles nous avait conduits une étude préliminaire du même sujet [2].

TABLEAU III.

Départements	Effectifs	Dénombrement selon la plus forte dilution donnant +++					
		1/240	1/480	1/960	Vibriose	Brucellose	Vibriose & Brucellose
Ain	48	14	1	1	16		
Aisne	8	2	3	1	3	1	3
Ardennes	15	7	3	1	10	1	1
Aube	29	3		1		11	4
Aveyron	69	18	7		5	8	7
Charente Maritime	7	3	1		1	3	2
Eure	8	2	1		2	1	
Haute Marne	15	3	4		5	1	2
Loir et Cher	9	1	2			2	
Manche	137	41	31	9	15	22	41
Orne	62	19	9	2	19	4	8
Seine et Marne	30	12	7	1	2	3	10
Seine et Oise	263	49	26	7	21	35	38
Vienne	4	1		1		1	1
Vosges	31	12	12	5	27	1	2
Yonne	207	69	32	14	73	31	29
Totaux	942	256	139	43	199	125	148
		182 (19.3%)			275		
		438 (46.5%)			347		

Enfin la lecture des réactions nous a suggéré deux remarques : 1° Alors que nombre de sérums se sont montrés entièrement négatifs vis-à-vis de l'antigène brucellique (0 dans toute la série de tubes), assez rares sont ceux qui, aux dilutions faibles, n'ont pas donné avec l'antigène vibrionien une agglutination caractérisée (++++) ou (+++); 2° Le phénomène de zone n'a pas été observé dans la séro-agglutination vibrionienne.

RÉSUMÉ. — Une enquête sérologique intéressant 16 départements français, et portant sur un millier de vaches et taureaux, a montré que les sujets pouvant être considérés comme infectés de vibriose représentaient, globalement, 1/5 de cet effectif, les animaux suspects seulement d'infection vibrionienne représentant, en outre, 1/4 du même effectif.

BIBLIOGRAPHIE

- [1] J. GALLUT. *Ann. Inst. Pasteur*, 1952, **83**, 449 et 455.
 [2] H. JACOTOT, J. GALLUT et A. VALLÉE. *Acad. Vét. de France*, 1954, **27**, 153.

**CONTRIBUTION A L'ETUDE
DES TESTS CYTO-CHIMIQUES EN RELATION
AVEC QUELQUES ACTIVITÉS ENZYMATIQUES
DES MYCOBACTÉRIES
(PROPRIÉTÉS CATALASIQUE ET URÉASIQUE)**

I. — TEST SANS LAVAGES MULTIPLES DU GERME

par J. DESBORDES, Et. FOURNIER et DENISE ALIX.

(*Centre Hospitalier Emile-Roux [Service du D^r JEAN PARAF],
Institut National d'Hygiène [Professeur BUGNARD]
et Ecole des Hautes Etudes [Directeur adjoint : JEAN DESBORDES,
Laboratoire de Biochimie neurologique].*)

Les études menées depuis quelques années sur le comportement des germes isolés des produits pathologiques provenant de tuberculeux soumis à différentes thérapeutiques par antibiotiques, semblent montrer des altérations de divers systèmes enzymatiques [perte d'activité catalasique, baisse de l'activité uréasique] (Middlebrook [4], Singer et Cysner [8], entre autres).

Cependant, certains résultats paraissent différents selon les auteurs (Bloch [2], Cohn [3], etc.).

Nous avons pensé qu'il serait peut-être intéressant de voir si ces retentissements métaboliques ont une incidence quelconque sur les résultats relatifs aux tests cyto-chimiques. A première vue, il semble que ces tests (tests au Rouge Neutre et au Bleu de Nil) soient peu modifiés. Cependant nous avons montré récemment [4] que les Mycobactéries semblaient être revêtues de couches périphériques de textures différentes, mises en évidence par des lavages successifs à l'alcool méthylique, à l'alcool-éther, etc.

Par ailleurs, Russe et Barclay [7] viennent de montrer que les germes cultivés en présence d'INH révélaient une chute de leur teneur en lipides : 11 p. 100 contre 16 p. 100 chez les témoins. Cette différence portait surtout sur les lipides extractibles par l'alcool méthylique à froid (5 p. 100 contre 9 p. 100) et par le benzène à chaud (2 p. 100 contre 3 p. 100).

Nous avons entrepris l'étude du comportement des germes isolés de quelque 300 malades examinés au Centre Hospitalier Emile-Roux depuis deux ans, vis-à-vis du test au Bleu de Nil. Ces germes étaient tous testés du point de vue activité uréasique et catalasique en suivant les techniques précédemment décrites [4 bis].

Dans tous les cas, nous avons pratiqué simultanément une réaction cytologique au Bleu de Nil à pH 11 telle que nous l'avons précédem-

ment publiée, avec un seul lavage à l'alcool-éther à froid, et une inoculation à deux cobayes.

RÉSULTATS. — 1° *Pouvoir uréasique et réaction au Bleu de Nil.* — Nous n'avons pas observé de rapprochement possible entre l'intensité de la réaction à l'uréase et le test du Bleu de Nil à un seul lavage. Presque tous les germes, quelle que soit leur sensibilité ou leur résistance à l'INH ou à la streptomycine, gardaient une forte colorabilité des lipides acides après un seul lavage à l'alcool-éther, et une action pathogène indéniable sur le cobaye.

Ceux qui avaient une réaction négative au Bleu de Nil après un seul lavage (liée à une inertie nette vis-à-vis du cobaye aux doses usuelles) se partageaient par moitié entre germes uréase + et germes uréase —.

2° *Pouvoir catalasique et réaction au Bleu de Nil.* — Sur 150 souches nous n'avons trouvé aucun cas de germes, ayant perdu à la fois leur activité catalasique et leur colorabilité par le Bleu de Nil après un seul lavage à l'alcool-éther à froid. Ces germes, bien que catalase —, ont cependant toujours déterminé des lésions au point d'inoculation (le plus souvent minimales, il est vrai). Cette persistance de l'équipement périphérique, mis en évidence avec un unique lavage alcool-éther, que nous considérons comme essentielle aux manifestations pathogènes (alors que les effets pathologiques sont moindres avec les germes catalase —), mérite d'être soulignée.

A l'inverse, nous avons constaté l'existence de germes ayant perdu tout ou partie de leur colorabilité au Bleu de Nil, après un seul lavage (avec une chute ou une disparition de leur aptitude pathogène pour le cobaye) et qui étaient doués d'une activité catalasique marquée.

CONCLUSION. — Le test au Bleu de Nil avec un seul lavage à l'alcool-éther à froid semble donc insuffisant pour rendre compte des altérations possibles des Mycobactéries isolées des produits pathologiques provenant de malades soumis à une thérapeutique prolongée.

Nous nous proposons de poursuivre cette étude en appliquant la technique des lavages multiples par les solvants classiques des lipides.

BIBLIOGRAPHIE

- [1] J. DESBORDES, Et. FOURNIER et D. ALIX. *Ann. Inst. Pasteur*, 1955, **88**, 240.
- [1 bis]. *Idem, ibid.* (sous presse).
- [2] H. BLOCH, D. WIDELock et L. R. TEIZER. *Amer. Rev. Tub.*, 1953, **68**, 734.
- [3] M. L. COHN et coll. *Amer. Rev. Tub.*, 1954, **70**, 465.
- [4] G. MIDDLEBROOK et M. L. COHN. *Science*, 1953, **118**, 297.
- [5] G. MIDDLEBROOK et N. B. SCHAEFFER. *Amer. Rev. Tub.*, 1954, **70**, 852.
- [6] G. MIDDLEBROOK. *Amer. Rev. Tub.*, 1954, **69**, 471.
- [7] RUSSE et BARCLAY. *Amer. Rev. Tub.*, 1955, **72**, 713.
- [8] J. SINGER et E. CYSNER. *Amer. Rev. Tub.*, 1952, **65**, 779.

ACTION DE LA CHLOROPHYLLE SUR LE BACILLE TUBERCULEUX

par M^{me} AITOFF.

(Laboratoires Debat)

Parmi les produits que j'ai expérimentés *in vitro* du point de vue de leur action tuberculicide, il y en a un qui a attiré spécialement mon attention : c'est la chlorophylle hydrosoluble.

Werner [1] avait pu démontrer son action bactériostatique sur un nombre considérable de microbes pathogènes et avant lui Dissman et Iglauer [2], dans un article paru dans la *Wien. klin. Wschr.*, rapportaient leurs expériences portant sur 12 souches de bacille de Koch. Ils avaient constaté une inhibition complète de toutes les souches par 7 μ g de chlorophylle, dans 7 cas, avec 0,7 μ g et dans un cas même avec 0,07 μ g du produit. Les auteurs n'hésitaient pas à comparer cette action à celle de la streptomycine !

Je possédais justement trois échantillons de chlorophylle hydrosoluble préparés par M. Flesh, avec lesquels j'entrepris mon expérimentation. Quelle ne fut pas ma surprise de voir que la chlorophylle, non seulement n'était pas tuberculicide, mais qu'au contraire des solutions en Dubos titrant à 50-100 μ g donnaient lieu au développement de cultures aussi abondantes, si ce n'est plus, que le témoin. La culture apparaissait d'une manière précoce après quatre jours de séjour à l'étuve. On pouvait, par conséquent, parler plutôt de facteur de croissance que d'action tuberculicide.

L'épreuve avait été faite avec la souche H37Rv et des souches fraîchement isolées de malades, sensibles ou résistantes aux tuberculicides : isoniazide, streptomycine et PAS.

Je me suis procuré différents échantillons de chlorophylle. La chlorophylle anglaise cristallisée, la chlorophylle américaine avec et sans cuivre. On sait que les sels de cuivre ont par eux-mêmes un pouvoir inhibitif sur le bacille de Koch. Tous ces échantillons se sont montrés totalement dépourvus d'action tuberculicide. Les bacilles de Koch poussaient parfaitement bien dans des solutions de 100 μ g et 200 μ g de chlorophylle.

Un autre phénomène attira mon attention. Au début de l'année dernière, je m'étais aperçue que ma souche H37Rv ne formait plus de « cordes » en Dubos. J'attribuais ce fait aux repiquages multiples et étais décidée à la faire passer par le cobaye pour la rajeunir.

Or, sous l'influence de la chlorophylle, j'obtins des cordes impressionnantes avec les mêmes cultures de H37Rv qui, normalement, n'en formaient plus. C'étaient, par endroits, de vraies têtes de méduse, qui ne laissaient pas de place aux amas irréguliers et aux germes isolés (fig. 1 et 2).

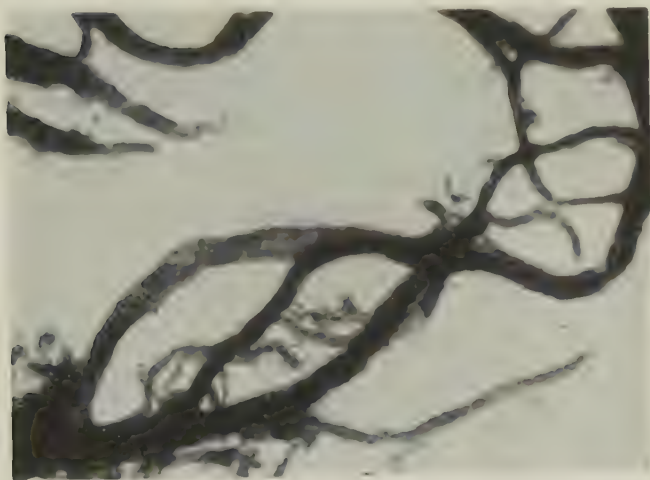


FIG. 1. — Formation de cordes avec la chlorophylle.
Souche sensible. Cordes rouges.

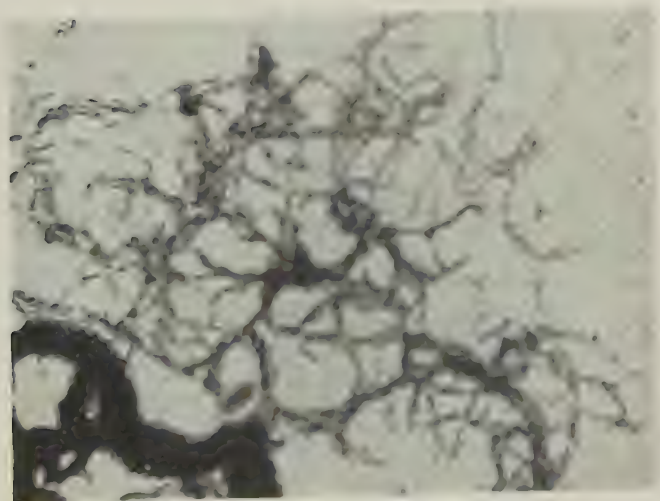
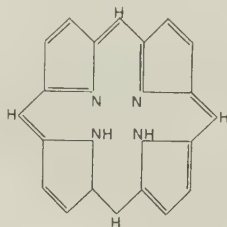


FIG. 2. — Formation de cordes avec la chlorophylle. Souche résistante.
Cordes rouges et bleues.

J'ai obtenu la formation de cordes, absentes chez le témoin, avec la protoporphyrine, l'hémine et le cytochrome C. Toutes ces substances ont en commun avec la chlorophylle le noyau porphyrique (fig. 3).

Le « cord factor » a donné lieu à beaucoup de travaux. Tout dernièrement Noll et Bloch [3] ont isolé de différentes souches humaines et bovines un esther de l'acide mycolique, à poids moléculaire d'environ 1 570, qui, par hydrolyse acide, scinde la molécule en acide mycolique,



PREMIERS RÉSULTATS
D'UNE TECHNIQUE PERSONNELLE D'ISOLEMENT
DU BACILLE TUBERCULEUX PAR LE TEEPOL
(2 592 CULTURES SUR 15 372 TUBES)

par F. TISON.

(*Sanatorium de Praz-Coulant [Haute-Savoie]*)

Après une étude systématique [1], nous étions arrivé à préconiser une technique qui a fait l'objet d'études en profondeur [2, 3] et dont la théorie et les résultats ont été analysés de façon critique [4].

Depuis, cette méthode est entrée dans la pratique courante et nous avons ensemencé 2 562 cultures sur 6 tubes, soit : 15 372 tubes de Jensen.

Nous ne reviendrons pas sur la technique. Elle est exposée dans le détail par ailleurs [5] et n'est valable que si ses données sont respectées en tous points. De nombreux auteurs ont bien voulu nous confirmer les bons résultats obtenus, en France et à l'étranger.

A. SENSIBILITÉ DE LA MÉTHODE. — Nous n'avons retenu ici que les cultures faites à partir de produits souillés (crachats recueillis directement par tubage, urine, pus, etc.) reconnus comme « négatifs » par les procédés optiques les plus poussés [5, 7].

Nous avons écarté les cultures demandées « pour une mesure de résistance aux antibiotiques », dont une certaine proportion concerne des produits connus comme bacillifères.

Sur 1 126 produits négatifs aux examens optiques, 107 ont été positifs à la culture.

Autrement dit : 9,51 p. 100 des malades négatifs aux examens microscopiques les plus poussés se sont révélés positifs à la culture.

Cette proportion passe à 16,9 p. 100 en ce qui concerne le groupe des cultures demandées « en vue d'une résistance » (243 sur 1 436). Elle est sans signification, comme nous l'avons vu ci-dessus.

B. DÉLAI DE RÉPONSE DE LA CULTURE AU TEEPOL. — Cette étude ne porte que sur la pratique courante et ne concerne pas certaines souches très particulières.

Les lectures sont faites toutes les deux semaines, ce qui nous a permis de séparer les cultures en 4 catégories : apparition des colonies identifiables avant le quinzième jour, du quinzième au trentième jour, du trentième au quarante-cinquième jour, du quarante-cinquième au soixantième jour.

Pour la totalité des cultures positives (350), il nous a été possible d'établir la courbe de la figure 1.

Il est facile de constater que la majorité des cultures se révèle positive du quinzième au trentième jour.

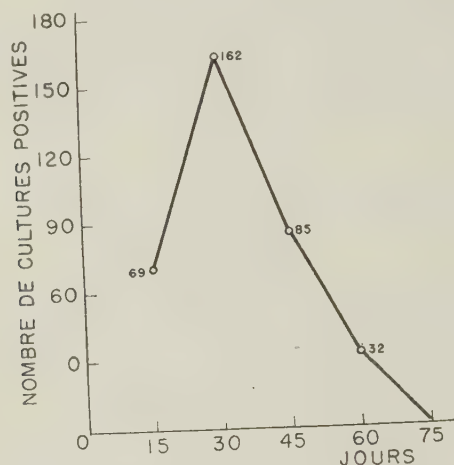


FIG. 1.

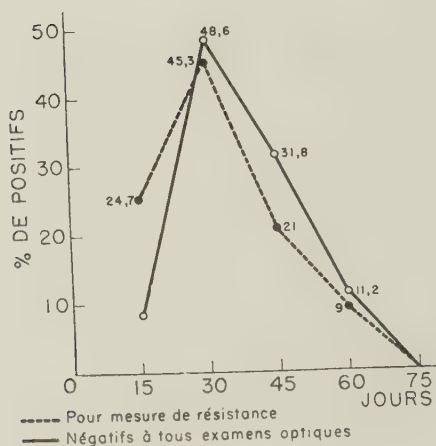


FIG. 2.

Deux cultures seulement se sont manifestées après le soixantième jour.

La précocité d'apparition semble avant tout conditionnée par la richesse en bacilles du produit ensemencé.

En dissociant les deux courbes concernant les deux lots de produits, nous en avons la démonstration :

Le pourcentage de positifs est plus important dans la première quinzaine (24,7 p. 100) en ce qui concerne le lot « pour résistance » qui contient un certain nombre de crachats très bacillifères. La courbe intéressant les produits négatifs aux examens optiques ne révèle, par contre, que 8,4 p. 100 de positifs dans la première quinzaine (fig. 2).

C. LES SOUILLURES. — L'élimination des germes indésirables étant le gros problème, il nous a paru intéressant de compter les tubes souillés, après ensemencement, par des bactéries non tuberculeuses, des levures, des champignons, etc.

Sur : 15 372 tubes, 159 ont été souillés, soit : 0,97 p. 100.

Mais, comme chaque culture est ensemencée sur 6 tubes, ces souillures n'intéressent pas toujours tous les tubes d'un même ensemencement, et ne compromettent pas ainsi forcément le résultat. En fait, dans la majorité des cas, un seul tube est souillé.

Sur : 2 372 cultures, 2 seulement ont été compromises en totalité, soit : 0,07 p. 100.

A la sensibilité de la méthode, vient donc s'ajouter un facteur de sécurité.

Tous les autres détergents que nous avons essayés jusqu'à présent se sont révélés décevants. Seul le teepol nous a permis d'obtenir une homogénéisation remarquable sans léser les bacilles de Koch.

L'effet « mouillant », en favorisant les échanges nutritifs, est peut-être à l'origine d'une certaine précocité qui, alliée à la sensibilité et à la sécurité, rend cette méthode précieuse en clinique [6].

BIBLIOGRAPHIE

- [1] F. TISON. *Rev. Tub.*, 1953, **17**, 943.
- [2] F. TISON et A. LOZÉ. *Ann. Inst. Pasteur*, 1954, **87**, 445.
- [3] F. TISON. *Ann. Inst. Pasteur*, 1954, **87**, 735.
- [4] F. TISON et J. AUDRIN. *Ann. Inst. Pasteur*, 1955, **89**, 121.
- [5] F. TISON et J. AUDRIN. *Recherche, isolement et étude du bacille tuberculeux (Techniques de laboratoire)*. Masson, édit., Paris, 1956.
- [6] F. TISON. *Rev. Tub.*, 1954, **18**, 588.
- [7] P.-E. DAVY. *Mémoire à l'Acad. de Méd.*, 1946.

SUR LA MICROFLORE DÉNITRIFICATRICE DES TOURBES ACIDES

par J. POCHON et A. I. NAGHIB.

(*Institut Pasteur. Service de Microbiologie du Sol*)

Grandes sont les analogies microbiologiques entre Mor forestiers et tourbes acides (Duchaufour et Pochon [1], Pochon [2], de Barjac [3]). En ce qui concerne plus particulièrement la microflore dénitrificatrice de ces deux types de sols, on note une activité réduite (comparée à celle d'un Mull, par exemple) ; de plus, cette activité, dans les tourbes, décroît fréquemment avec la profondeur.

Au sein de cette microflore dénitrificatrice, la répartition des germes aérobies et anaérobies, sporulés et asporulés, a été précisée dans les Mor [4]. Les aérobies dominent et presque tous sont asporulés (90 p. 100) ; au contraire, la majorité des anaérobies sont sporulés (66 p. 100).

Pour compléter la comparaison entre microflore des Mor et des tourbes acides, il nous a donc semblé intéressant d'étudier la répartition ci-dessus dans une tourbe acide et de préciser également sa variation avec la profondeur.

L'analyse a porté sur deux échantillons (1) d'une tourbière vosgienne, à 1 200 m d'altitude ; l'un est un prélèvement de surface, l'autre à 0,80 m de profondeur.

Ces deux échantillons ont tout d'abord été soumis à une analyse microbiologique complète, avec les techniques habituellement utilisées dans ce laboratoire [5]. Les résultats sont résumés dans le tableau suivant, qui donne le nombre de germes par gramme de terre, calculé d'après les tables de Fischer.

	SURFACE	PROFONDEUR
Fixateurs d'azote	0	0
Protéolytiques (gélatine)	$8,6 \cdot 10^6$	$3,8 \cdot 10^6$
Ammonifiants	$1,7 \cdot 10^2$	0
Nitrificateurs	0	0
Dénitrificateurs	10^3	10^5
Cellulolytiques aérobies	0	0
Cellulolytiques anaérobies	ε	ε
Hémicellulolytiques	10^3	40
Amylolytiques	$7,3 \cdot 10^4$	$1,7 \cdot 10^2$
Sulfatoréducteurs	10	10
Oxydants du soufre	0	0
Microflore bactérienne totale	$1,3 \cdot 10^6$	$7,7 \cdot 10^3$
Actinomycètes	0	0
Champignons	$1 \cdot 10^4$	$7 \cdot 10^4$

(1) Aimablement envoyés par M. Duchaufour.

Ces chiffres confirment le peu d'activité biologique des tourbes et la diminution de cette activité avec la profondeur.

Les points un peu particuliers à signaler ici sont cependant, d'une part l'égalité apparente des dénitrificateurs dans les deux horizons, d'autre part, la richesse en champignons de l'horizon profond, si bien que le rapport bactéries/champignons, qui est de 133 en surface, descend à 0,1 à 0,80 m.

Puis la microflore dénitrificatrice a été soumise à une étude plus poussée d'ordre qualitatif.

Dans ce but, une échelle de dilution plus serrée a été réalisée, de 2 en 2 à partir de 10^{-2} . Avec cette série de dilutions, ont été étudiées :

a) L'influence de l'aérobiose et de l'anaérobiose : ensemencement de tubes incubés les uns sous air, les autres sous azote (8 tubes par dilution).

b) La répartition des germes sporulés et asporulés : ensemencement de tubes après chauffage des dilutions pendant dix minutes à 80° ; là encore les uns sont placés sous air, les autres sous azote. Il est à noter que les sporulés, avec cette technique, s'ils cultivent seuls à partir de l'émulsion chauffée, sont comptés avec les non sporulés à partir de l'émulsion non chauffée : il en faut tenir compte dans l'interprétation des résultats.

Dans tous les tubes, après sept jours, les nitrites ont été recherchés avec le réactif de Griess. Les résultats sont résumés dans le tableau suivant :

	AÉROBIES		ANAÉROBIES	
	non sporulés + sporulés	sporulés	non sporulés + sporulés	sporulés
Surface	$3,9.10^4$	$5,2.10^3$	$< 10^2$	$< 10^2$
Profondeur	$1,3.10^4$	$1,3.10^4$	$< 10^2$	$< 10^2$

Avec cette échelle plus serrée de dilutions, on constate tout d'abord une différence quantitative des dénitrificateurs en fonction de la profondeur ; différence faible mais cependant significative et en accord avec les faits déjà observés [3 et 4].

Autres constatations importantes :

La prédominance considérable des germes aérobies sur les anaérobies, à tous les horizons.

La prédominance des non sporulés (85 p. 100) en surface alors que, en profondeur, on ne trouve vraisemblablement que des sporulés, dont on peut se demander s'ils y sont actifs ou seulement sous forme de résistance.

Ces résultats sont du même ordre que ceux trouvés dans les Mor. La répartition des germes réducteurs de nitrate met donc en évidence une analogie de plus entre les microflore des Mor et des tourbes acides.

BIBLIOGRAPHIE

- [1] DUCHAUFOUR et J. POCHON. *Ann. Inst. Pasteur*, 1955, **88**, 261.
- [2] J. POCHON. *Ibid.*, 1956, **90**, 352.
- [3] H. DE BARJAC. *Thèse Doctorat ès sciences*. Paris, 1955.
- [4] A. I. NAGHIB. *Thèse Ph. Dr.* Londres, 1955.
- [5] J. POCHON et coll. *Manuel technique d'analyse microbiologique des sols*. Masson, éd, Paris, 1954.

TUBES A LAMELLE APPLICABLES A DIFFÉRENTES TECHNIQUES DE CULTURES DE TISSUS

par GEORGES BARSKI.

(*Institut Pasteur. Service des Virus*)

Nous avons adopté pour l'étude cytologique des virus en cultures de tissus un modèle de tube aplati à lamelle amovible qui nous a donné satisfaction et que nous allons décrire brièvement.

Ce récipient est fabriqué à partir de tubes standards en Pyrex de 16 mm de diamètre et de 160 mm de longueur, dont le fond est remoulé à chaud dans un moule en laiton sur une longueur de 40 mm, de façon à aplatir et à élargir un côté du tube ; la section du tube à ce niveau, dans le plan perpendiculaire à l'axe, présente alors la forme d'un fer à cheval. De plus, la partie élargie du tube est séparée du reste par une légère encoche. Dans l'élargissement à surface plane (quelque 4,5 cm²) vient se loger une lamelle de dimensions standards de 12 x 32 mm. Quand le tube est placé en position horizontale, le liquide (1,5 à 2 cm³) introduit dans cet élargissement s'étale en couche uniforme d'environ 2 mm d'épaisseur.

Le tube, fermé comme d'habitude avec un bouchon de caoutchouc, peut être soit laissé immobile dans cette position, soit mis dans un appareil à tubes roulants du modèle habituel. Malgré le mouvement de rotation, la lamelle reste fixe dans l'élargissement du tube par simple effet de capillarité.

Nous utilisons ces tubes pour des cultures de fragments tissulaires sur plasma en effectuant la mise en culture et les repiquages à la surface de la lamelle, soit à l'intérieur du tube, soit en sortant la lamelle à l'aide d'un crochet en fil d'acier et en la glissant dans le tube une fois l'opération terminée. Les conditions de croissance dans ces cultures sont au moins aussi bonnes que dans les flacons de Carrel ou dans les tubes roulants habituels. A cela s'ajoute la facilité de leur préparation et de leur entretien.

La préparation dans ces mêmes récipients de cultures faites à partir de suspensions cellulaires est également facile. Grâce à la forme du récipient, les cellules se déposent, quand ce dernier reste immobile en position horizontale, presque en totalité à la surface de la lamelle.

Nous préparons de cette manière en grande série, en vue d'obtenir des préparations colorées sur lamelles, des cultures à partir de suspensions de cellules trypsinées (de reins de mammifères adultes ou de différents organes et tissus embryonnaires), ainsi qu'à partir des suspensions cellulaires d'ascites artificiels de lapin, de singe ou de rat [1].

Dans certains cas, il nous a paru avantageux de recouvrir la surface de la lamelle d'une couche très mince de formvar qui peut favoriser l'adhésion et l'étalement des cellules [2].

L'observation courante de ces cultures se fait d'abord au faible grossissement directement à travers l'épaisseur de la paroi du tube et de la lamelle. Dans la mesure où cela est jugé utile, les mêmes cultures peuvent être soumises à un examen plus détaillé au fort grossissement, à l'état vivant ou après fixation.

Dans le premier cas, nous montons la lamelle avec la culture dans une chambre à perfusion [3]. Ce montage permet de continuer la culture pendant longtemps sans grandes perturbations en effectuant les observations continues dans de très bonnes conditions optiques.

Les mêmes cultures peuvent être, après lavage rapide au sérum physiologique chauffé à 37° C, fixées directement dans le tube, ce qui est appréciable, surtout dans les cas où la culture contient un matériel infectieux. L'épaisseur de la préparation est de l'ordre de 1 à 10 μ , la fixation est presque instantanée avec la plupart des fixateurs, et la qualité des images cellulaires particulièrement bonne.

Par rapport aux techniques d'histologie classique opérant avec des pièces à fixer et des coupes ordinaires étalées sur lames, les temps de fixation doivent être raccourcis et les temps de coloration augmentés approximativement deux à trois fois.

Ainsi, les cultures peuvent être préparés d'après une des méthodes couramment pratiquées, et si on le désire, en série. Elles peuvent servir aussi bien à la culture de tissus simple qu'aux études de l'infection bactérienne ou virale *in vitro*.

Leur avantage essentiel réside dans la facilité avec laquelle, à chaque stade de la culture, on peut la destiner soit au repiquage, soit à l'examen détaillé à l'état vivant, soit enfin à la fixation et à l'examen au microscope optique ou électronique.

BIBLIOGRAPHIE

- [1] G. BARSKI, G. MESSORE et P. LÉPINE. *Ann. Inst. Pasteur*, 1955, **89**, 366.
- [2] G. BARSKI, M. LAMY et P. LÉPINE. *Ann. Inst. Pasteur*, 1955, **89**, 415.
- [3] G. BARSKI et R. ROBINEAUX. *Ann. Inst. Pasteur*, 1956 (sous presse).

CHAMBRE A PERFUSION DÉMONTABLE ET STÉRILISABLE POUR CULTURES DE TISSUS DE LONGUE DURÉE

par G. BARSKI et R. ROBINEAUX.

(Institut Pasteur, Service des Virus,
et Laboratoire de Recherches d'Immunopathologie,
Hôpital Saint-Antoine, Paris)

L'étude de la cytopathologie infectieuse en cultures cellulaires *in vitro* impose certaines exigences : l'observation étendue sur plusieurs jours dans des conditions excluant les dégénérescences non spécifiques, culture facilement accessible pour les changements de milieu, introduction ou élimination de l'agent infectieux, et enfin stérilisation du dispositif avant et après utilisation.

De nombreuses chambres à perfusion pour cultures tissulaires ont été proposées jusqu'ici ; nous venons d'en faire une revue récemment [1]. Aucune ne répond en tous points à ces exigences.

Nous avons réalisé une chambre exécutée en matière plastique stérilisable, l'araldite B. Ce dispositif nous a suffisamment donné satisfaction pour que nous en donnions la description et les détails d'utilisation.

Nous avons décrit précédemment [2] les qualités que présente l'araldite B quant à son utilisation en biologie. Rappelons qu'elle résiste sans s'altérer à une stérilisation à 120° C, qu'elle est dépourvue de toute toxicité pour les cellules animales *in vitro* et qu'elle se laisse facilement mouler et travailler.

Le corps de cette chambre à perfusion exécuté en araldite mesure 75 mm de long sur 25 mm de large, soit exactement les dimensions d'une lame microscopique ordinaire. Son épaisseur, que nous avons fixée à 2 mm, permet l'examen microscopique en contraste de phase et au fort grossissement, à la condition d'utiliser un condensateur à longue focale. (Nous utilisons le dispositif à longue focale de Zeiss Winkel.) Cette plaque présente en son centre un évidement rectangulaire de 28 × 8 mm qui formera les parois latérales de la chambre. Deux lamelles de 32 × 12 mm fermeront cet évidement en formant les faces supérieure et inférieure de la chambre, la lamelle supérieure portant la culture. En outre, quatre trous permettront le passage de quatre tiges filetées destinées au blocage de l'ensemble. Deux tubulures en acier inoxydable de 10/10 de millimètre de diamètre, logées dans l'épaisseur de l'araldite débouchent de part et d'autre de l'ouverture et permettent, après le montage de la chambre, de changer à tout moment le contenu de celle-ci. Deux plaquettes en acier inoxydable de 0,5 mm d'épaisseur maintiendront l'ensemble hermétiquement

clos, grâce aux quatre tiges filetées et boulonnées traversant la plaque d'araldite de part en part. Les faces internes de ces deux plaquettes sont recouvertes d'une couche très mince de caoutchouc synthétique à base de néoprène (2) faisant office de joint.

Le montage est effectué de la façon suivante. Toutes les pièces sont stérilisées d'avance à l'autoclave. On enduit légèrement de vaseline les bords de l'ouverture rectangulaire sur les deux faces de la lame d'araldite. On met en place la lamelle inférieure puis, après avoir engagé dans les trous correspondants les quatre tiges filetées, on met en place la lamelle supérieure porte-culture.

La plaquette supérieure vient recouvrir le tout. Elle est ensuite boulonnée sur les tiges filetées.

On injecte aussitôt dans la chambre ainsi fermée à travers une des

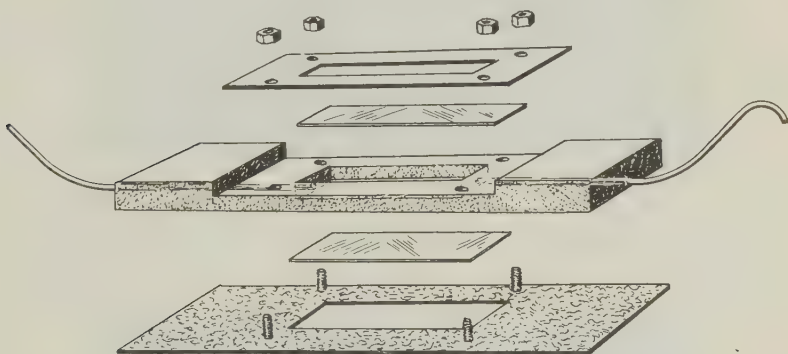


FIG. 1. — Les éléments de la chambre à perfusion avant leur assemblage.

tubulures et à l'aide d'une seringue à aiguille très fine, le milieu nutritif, additionné ou non des produits ou des virus étudiés. L'expérience nous a montré que la présence de deux bulles d'air à l'intérieur de la chambre à ces deux extrémités est particulièrement favorable au maintien prolongé de la culture dans de bonnes conditions.

Nous effectuons les changements de milieu toutes les vingt-quatre à quarante-huit heures, soit avec un milieu neuf, soit avec un milieu « conditionné » dont une réserve de 2 à 3 ml se trouve dans un tube bouché entre la chambre et la seringue. Dans ce dernier cas, pour renouveler le milieu, on aspire le liquide nutritif de la chambre vers le tube où il se mélange avec le liquide de réserve. Une partie de ce mélange est ensuite réinjectée dans la chambre.

Nous utilisons en général la perfusion intermittente que nous préférons pour ses résultats à la perfusion continue.

La chambre de culture peut être maintenue à température constante

(2) Nous désirons exprimer nos remerciements à M. J. Lévêque, de l'Institut français du Caoutchouc, pour l'aide qu'il nous a apportée dans la solution de ce problème.

sur le microscope grâce à une platine chauffante spéciale à circulation d'eau alimentée par un dispositif thermostatique dont les caractéristiques et les avantages feront l'objet d'une prochaine note.

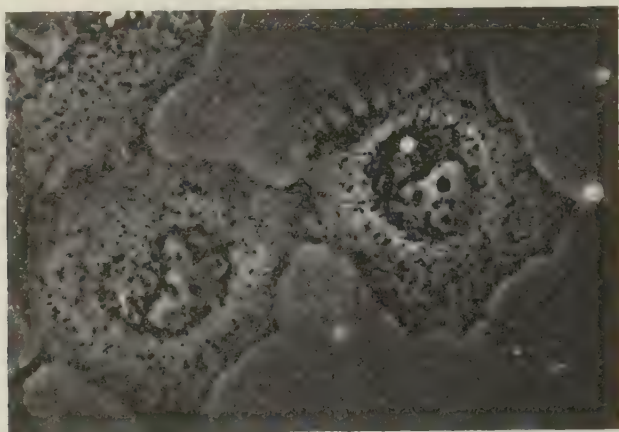


FIG. 2. — Aspect de cellules de la souche de carcinome humain Hela photographiées dans la chambre à perfusion. Culture de treize jours dont cinq jours dans la chambre (gross. environ 900 x).

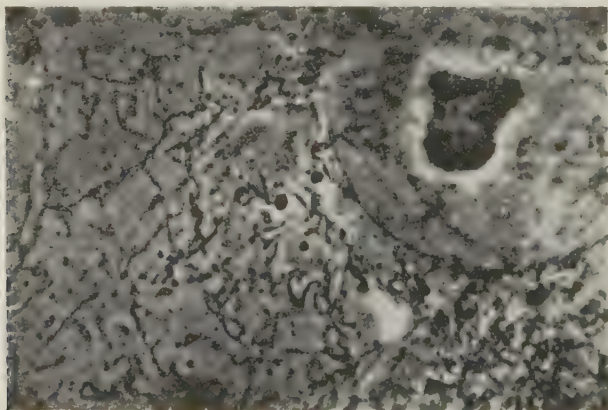


FIG. 3. — Détails d'une cellule de rein de singe photographiée dans la chambre à perfusion. Culture de quinze jours dont cinq jours dans la chambre à perfusion (gross. environ 2 000 x).

Notre chambre de culture s'est révélée particulièrement précieuse pour les examens de longue durée des cultures que nous préparons préalablement dans un système de tubes à lamelle, stationnaires ou

roulants [3] avec des fragments tissulaires ou des cellules en suspension. Nous l'avons utilisée dans nos recherches sur les effets cytopathogènes de différents virus *in vitro* [4, 5].

La maniabilité, la parfaite étanchéité du dispositif, ainsi que les bonnes conditions d'observation microscopique en contraste de phase qu'il permet en font un instrument bien adapté à ce genre de recherches.

Il peut, bien entendu, servir également à l'étude d'autres phénomènes de la vie cellulaire qui exigent une observation continue et prolongée dans de bonnes conditions de culture *in vitro* (3).

BIBLIOGRAPHIE

- [1] R. ROBINEAUX et BARSKI. *Mikroskopie*, 1956 (sous presse).
- [2] G. BARSKI. *Bull. Micr. appl.*, 1954, 4, 112.
- [3] G. BARSKI. *Ann. Inst. Pasteur*, 1956, 90, 512.
- [4] G. BARSKI, R. ROBINEAUX et M. ENDO. *Proc. Soc. exp. Biol. Med.*, 1955, 88, 57.
- [5] G. BARSKI, R. ROBINEAUX et M. ENDO. *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, 1955, 64, 899.
- [6] K. M. RICHTER et N. W. WOODWARD. *Exp. Cell. Res.*, 1955, 9, 585.

VARIÉTÉS PROTÉOLYTIQUES DE *MORAXELLA LWOFFI* ET DE *MORAXELLA GLUCIDOLYTICA* (*BACT. ANITRATUM*)

par D. et M. PIÉCHAUD et L. SECOND.

(Institut Pasteur, Service de Microbie technique [D^r DUMAS])

Dans une note de 1950 [1] consacrée à l'étude de souches de *M. lwoffii*, nous avons décrit une nouvelle variété, *M. lwoffii* var. *glucidolytica*, qui était, comme nous l'indiquions, identique à *Bact. anitratum* de Schaub et Hauber [2] et B5W de Stuart [3].

Parmi les souches de *M. lwoffii* ou de sa variété glucidolytique étudiées ensuite, nous en avons rencontré 10 (ce qui représente un faible pourcentage, moins de 10 p. 100) douées de pouvoir protéolytique. Ce sont elles que nous entendons décrire ici et que l'on peut considérer comme des variétés protéolytiques.

Origines des souches : souche n° 1 : crachats ; n° 2 et n° 3 : ulcération rectale ; n° 4 : selles ; n° 5 : gorge ; n° 6 : conjonctivite ; n° 7 : méningite post-opératoire ; n° 8 et 9 : infections urinaires ; n° 10 : ulcère de la jambe.

Morphologie. La morphologie de ces bactéries est semblable à celle des autres *M. lwoffii*. Leur diamètre moyen, assez uniforme, est de

(3) Après la rédaction de cette note, nous avons pris connaissance de l'article de K. M. Richter et N. W. Woodward [6] dans lequel ces auteurs décrivent une chambre à perfusion qui s'inspire de principes semblables aux nôtres.

1 μ , avec d'assez grandes variations suivant les cultures. Elles se colorent facilement, se décolorent par la méthode de Gram, mais certains éléments peuvent avoir tendance à retenir le violet. Par coloration au bleu Borrel, on observe fréquemment un corpuscule métachromatique unique par bacille. Ces bacilles ont la forme de bâtonnets trapus à extrémités arrondies, courts au point de ressembler à des coques, ou nettement bacillaires. Leur groupement caractéristique est en diplobacille à deux articles égaux, mais on trouve aussi des cellules isolées, des chaînettes de quelques éléments, ou plus rarement des formes filamenteuses. Sur gélose, en culture de dix-huit à vingt-quatre heures, certaines souches sont diplococciques et peuvent faire penser à une *Neisseria* si l'on ne remarque pas les formes nettement diplobacillaires ou les rares formes filamenteuses. En bouillon de même âge, on trouve toujours des diplobacilles courts ou longs, des bacilles isolés et des chaînettes de quelques éléments. Pour un œil exercé, cet ensemble est tout à fait caractéristique. Nous avons pu (contrairement à ce que nous avons dit antérieurement) voir une capsule, mince en général, par examen à l'état frais en suspension dans l'encres de Chine. Ces bactéries sont immobiles à l'examen microscopique comme en culture dans la gélose molle et ne forment pas de spores. Leur corps nucléaire présente le même aspect que celui des autres *M. lwoffii*, et en particulier occupe, dans les cellules jeunes en phase de latence ou au début de la phase exponentielle, une grande partie du cytoplasme [4, 4]. La division se fait toujours selon le même axe. Ces caractères permettent de les distinguer formellement des Entérobactériacées et des Neisseriacées.

CARACTÈRES DE CULTURE. — Ces souches cultivent sur les milieux ordinaires, sans adjonction de sérum, à 37° ou mieux à 35°. En bouillon ou en eau peptonée, en dix-huit heures, le trouble est homogène, finement floconneux, et des ondes moirées apparaissent par agitation. Ensuite se forme une collerette ou un voile à la surface du milieu. Sur gélose, les colonies blanc jaunâtre ont 1 à 2 mm en dix-huit heures ; elles ont un bord régulier, une surface lisse légèrement bombée ; elles présentent une irisation dorée, à la lumière transmise sous une incidence convenable. On décèle un deuxième type de colonie, bleuté, plus transparent, non irisé, après quelques repiquages espacés en milieux artificiels. Le test d'oxydase (Gordon et MacLeod) est négatif.

En gélose profonde elles poussent en surface et à quelques millimètres au dessous ; elles se révèlent donc comme aérobies stricts. Elles se développent rapidement sur pomme de terre, en donnant une culture gris jaunâtre où chamois ; elles ne donnent pas d'indol ou d' SH_2 , ne réduisent pas le rouge neutre, n'hydrolysent pas l'urée (milieu de Ferguson et Hook ou milieu urée-tryptophane), ne réduisent pas les nitrates en nitrites en vingt-quatre à quarante-huit heures, ne forment pas d'acétoïne en milieu de Clark-Lubs. On n'observe pas d'hémolyse sur gélose au sang de cheval. Elles cultivent toutes très abondamment en milieu synthétique simple [5] avec un sel d'ammoniaque comme source d'azote et de l'alcool éthylique comme source de carbone.

Tous ces caractères leur sont communs avec *M. lwoffi* et *M. lwoffi* var. *glucidolytica*, mais les souches n° 2 et n° 4 n'acidifient aucun sucre ou alcool, tandis que les souches n°s 1, 3, 5, 7, 8, 9 et 10, comme la variété glucidolytique de *M. lwoffi* (*Bact. anitratum*), acidifient glucose, galactose, mannose, xylose, arabinose, ainsi que le lactose à 10 p. 100. En eau peptonée l'acidification débute après trente-six

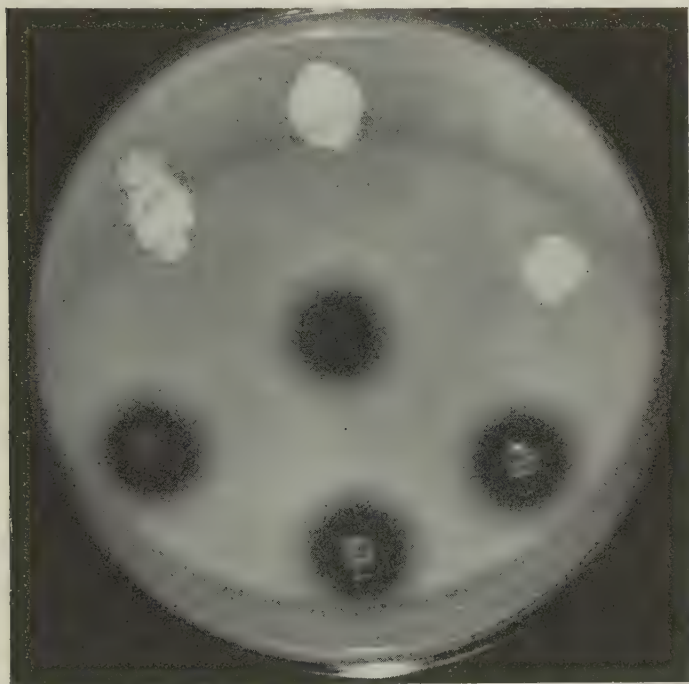


FIG. 1. — En haut, de gauche à droite, *M. lwoffi*, *M. glucidolytica*, *M. glucidolytica*. Au centre, *M. lwoffi* var. *liquefaciens*. En bas, trois souches de *M. glucidolytica* var. *liquefaciens*.

à quarante-huit heures en surface et gagne la profondeur en quelques jours ; sur gélose l'acidification apparaît toujours en moins de vingt-quatre heures.

Les deux premières souches alcalinisent le petit-lait tournesolé, alcalinisent le lait tournesolé et le peptonisent lentement, ou bien, plus souvent, donnent après quelques jours un caillot mou qui se rétracte ensuite et subit une digestion lente et partielle. Elles poussent en vingt-quatre heures sur gélose au citrate de Simmons en alcalinisant le milieu. Les autres souches alcalinisent le petit-lait tournesolé, puis l'acidifient vers le cinquième jour, alcalinisent légèrement le lait tournesolé dans les premiers jours, puis le coagulent après quatre à

cing jours en l'acidifiant et en réduisant l'indication dans la profondeur. Elles poussent en vingt-quatre heures sur gélose au citrate en l'alcalinisant.

Les deux variétés sont douées de pouvoir protéolytique. La gélatine nutritiveensemencée en piqûre est liquifiée en godet après un jour, puis en cylindre. Le sérum coagulé,ensemencé en strie, est nettement

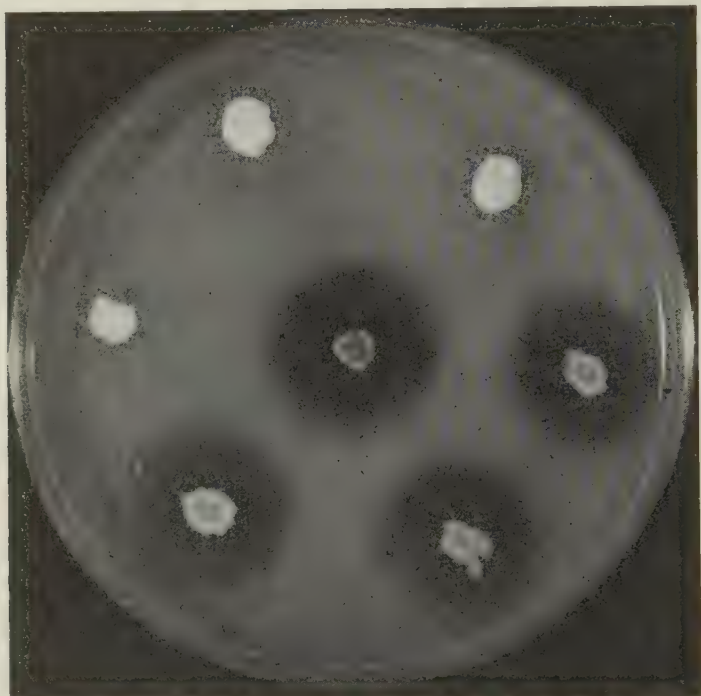


FIG. 2. — En haut, de gauche à droite, *M. lwoffi*, *M. glucidolytica*, *M. glucidolytica*. Au centre, *M. lwoffi* var. *liquefaciens*. En bas, trois souches de *M. glucidolytica* var. *liquefaciens*.

liquéfié dès le premier jour ; il peut être ensuite digéré en grande partie. Sur ce milieu les colonies s'enfoncent moins nettement dans le substrat que celles des variétés protéolytiques de *M. lacunata* ou *M. duplex* dont les cupules sont limitées par un bord tranché.

Par des procédés inspirés de ceux conseillés pour l'étude des *Bacillus* [6] le pouvoir protéolytique peut être mis en évidence très nettement et très rapidement, sur boîte de Petriensemencée en points. Pour le lait, on incorpore un tiers de lait à de la gélose nutritive : après dix-huit heures d'étuve à 35° on note un anneau de clarification autour de la culture (fig. 1). Pour la gélatine on ajoute

0,4 p. 100 de gélatine ou plus simplement 2 cm³ de gélatine nutritive à 25 cm³ de gélose nutritive : après dix-huit heures d'étuve, on met en évidence l'hydrolyse autour de la culture en inondant la gélose du réactif suivant : HgCl₂, 15 g ; HCl, 20 cm³ ; eau distillée, 100 cm³, qui précipite la gélatine non hydrolysée (fig. 2). La zone hydrolysée est plus large que celle que produit *M. duplex* var. *liquefaciens*. Dans les mêmes conditions, *M. lwoffii* et *M. lwoffii glucidolytica* ne manifestent, même après plusieurs jours de culture, aucun pouvoir protéolytique.

RELATIONS ANTIGÉNIQUES. — Toutes ces souches ont montré une relation étroite avec une souche de *M. lwoffii* var. *glucidolytica*. Elles s'agglutinent, vivantes, dans un sérum préparé avec cette souche (titre 1/800) : souche n° 1 au 1/400, souche n° 2 au 1/200, souche n° 3 au 1/100, souche n° 4 au 1/800, souche n° 5 au 1/1 600, souche n° 6 au 1/400, souche n° 7 au 1/400, souche n° 8 au 1/800, souche n° 9 au 1/400, souche n° 10 au 1/800.

TYPE DE FERMENTATION. — Il est intéressant de noter que la souche n° 3 se trouvait parmi celles confiées à Villecourt et Jacobelli dans leur étude comparative sur l'attaque du glucose [7]. Elle portait dans leur travail le n° 2. Elle avait été prise au hasard parmi celles douées de pouvoir protéolytique et d'acidification des sucres en eau peptonée. Par la méthode des bactéries lavées non proliférantes, elle s'est comportée, dans l'appareil de Warburg, comme les autres souches de *M. lwoffii* var. *glucidolytica*, et a oxydé quantitativement le glucose en acide gluconique. Il est donc probable que ce caractère leur est commun, ce qui viendrait encore confirmer leur étroite parenté.

Enfin, dans un article d'Henriksen [8] la description du diplobacille oxydase négatif I. B. paraît correspondre à celle des souches protéolytiques de *M. lwoffii* var. *glucidolytica*.

CONCLUSION. — En 1939, Lwoff [9] proposait un genre *Moraxella* pour grouper les diplobacilles déjà connus et les séparer des *Hemophilaeae*. En 1940, A. Audureau [5] décrivait deux nouveaux diplobacilles. A ce moment-là le genre *Moraxella* comprenait *M. lacunata* (sérophile) avec deux variétés : *typica* (protéolytique), *atypica* (non protéolytique) ; *M. duplex* (non sérophile) avec deux variétés : *liquefaciens* (protéolytique), *non liquefaciens* [non protéolytique] (1) ; *M. lwoffii*, diplobacille se distinguant des précédents par sa propriété de pousser en milieu synthétique simple, avec l'alcool éthylique comme source de carbone et un sel d'ammonium comme source d'azote. En 1950, nous avons individualisé une nouvelle bactérie très proche de *M. lwoffii* par l'ensemble de ses caractères morphologiques et culturels, s'en distinguant par le pouvoir d'acidifier certains sucres en eau peptonée, et que nous avons appelée pour cette raison

(1) Nous ne parlons pas ici de la variété *bovis* (Jones et Little), qui ne paraît pas se distinguer assez de *M. duplex* var. *liquefaciens*, et de la variété *josephi* insuffisamment décrite pour être classée avec certitude dans le genre.

M. lwoffii var. *glucidolytica*. Au cours de cette étude nous nous étions aperçus que des germes identiques avaient été décrits sous le nom de *Bact. anitratum* (Schaub et Hauber, 1948) classé dans un genre d'attente et de B5W (Stuart, Farmal et McGann, 1949) considéré comme une entérobactérie probable. Ultérieurement, le Dr S. D. Henriksen ayant demandé au Dr Lwoff et à nous-mêmes des souches de *Moraxella*, nous signala la positivité du test d'oxydase de Gordon et MacLeod pour les souches de *M. lacunata* et *duplex*, constatation que nous avions faite de notre côté sans lui accorder d'importance taxonomique, tandis que lui-même en fit ensuite [10] une des caractéristiques du genre. L'étude d'autres souches de *M. lacunata* et *duplex* confirma pour nous la constance du test et nous fûmes conduits, d'accord avec A. Lwoff, à concevoir le genre *Moraxella* comme constitué de deux groupes, groupe I : oxydase +, avec les espèces et variétés de *M. lacunata* et *duplex*, groupe II : oxydase —, avec *M. lwoffii* et *M. lwoffii* var. *glucidolytica*. Après l'étude de ces souches protéolytiques, le genre *Moraxella* peut être conçu comme formé de deux groupes dans lesquels chaque espèce existe sous une variété non protéolytique et une variété protéolytique, et nous proposons de diviser le genre comme suit (tableau I) en remplaçant *M. lwoffii* var. *glucidolytica* par *M. glucidolytica*.

TABLEAU I.

GENRE MORAXELLA		
Groupe 1 Oxydase +	<i>M. lacunata</i> var.) typica) atypica
	<i>M. duplex</i> var.) liquefaciens) non liquefaciens
Groupe 2 Oxydase —	<i>M. lwoffii</i> var.) liquefaciens) non liquefaciens
	<i>M. glucidolytica</i> var.) liquefaciens) non liquefaciens

BIBLIOGRAPHIE

- [1] D. et M. PIÉCHAUD et L. SECOND. *Ann. Inst. Pasteur*, 1951, **80**, 97.
- [2] I. G. SCHAUH et F. D. HAUBER. *J. Bact.*, 1948, **56**, 379.
- [3] S. A. STUART, S. FORMAL et MCGANN. *J. inf. Dis.*, 1949, **84**, 235.
- [4] M. PIÉCHAUD. *Congrès de Botanique*, Paris, 1954.
- [5] A. AUDUREAU. *Ann. Inst. Pasteur*, 1940, **64**, 126.
- [6] N. R. SMITH et coll. *Aerobic sporeforming bacteria*, Agriculture monograph, n° 16. U. S. Depart of Agriculture.
- [7] P. VILLECOURT et G. JACOBELLI. *Ann. Inst. Pasteur*, 1954, **86**, 493.
- [8] S. D. HENRIKSEN. *Acta path. microb. scand.*, 1947, **24**, 184.
- [9] A. LWOFF. *Ann. Inst. Pasteur*, 1939, **62**, 168.
- [10] S. D. HENRIKSEN. *J. gen. Microbiol.*, **6**, 318.

RECHERCHES SUR LA SUBSTANCE ANTIBIOTIQUE DU POLLEN

par RÉMY CHAUVIN et PIERRE LAVIE.

(Station de Recherches Apicoles de Bures-sur-Yvette)

Smith, Beck et Anderson [1] ont observé dans le pollen une substance qui accélère notablement la formation des spores chez *Bacillus larvae* White. L'extrait de pollen actif est obtenu par macération et agitation dans l'eau pendant vingt minutes et filtration au Buchner. Une concentration dans le milieu de culture correspondant à 2 p. 100 de pollen augmente la sporulation ; la croissance est inhibée au-dessus de 3 p. 100. L'extrait éthéré de pollen favorise aussi la sporulation ; le facteur de sporulation peut être enlevé par l'éther de sa solution aqueuse ; il existe dans des pollens variés : il est thermostable.

Au cours d'expériences effectuées sur souris recevant du pollen comme nourriture, nous avons remarqué la rareté des microorganismes dans les excréments de souris nourries au pollen par rapport à ceux des témoins (Chauvin, Defromont, Louveau et Vergé, 1952). A vrai dire, il n'en est pas toujours ainsi, et parfois l'on ne voit guère de différence ; mais il existe une technique pour mettre en évidence dans tous les cas, l'inhibition de la croissance bactérienne. On flambe les excréta jusqu'à changement de la coloration due à la calcination de la couche externe, puis on les broie aseptiquement avec un agitateur dans 2 cm³ de Ringer stérile. On ensemence ensuite, avec III gouttes de ce Ringer, 10 cm³ d'eau peptonée concentrée de Metchnikoff. Au bout de dix-huit heures d'incubation à 37°, la plupart des tubes ensemencés manifestent un très grand retard du développement bactérien comparativement au témoin ; ce retard peut aller jusqu'à l'inhibition totale. On peut effectuer aussi un prélèvement d'une macération des excréta aux fins de numération. On trouve fort peu de bactéries dans la macération provenant des sujets sur pollen et beaucoup dans celle des témoins. Cette différence dans la concentration des bactéries explique peut-être en partie les différences de développement des cultures.

Le test biologique quantitatif. — Il est facile de mesurer *in vitro* l'activité du pollen en se servant d'extrait préparé comme on le verra tout à l'heure. Dans la technique standard, on utilise de l'eau peptonée à 10 p. 1 000 plus 25 g de gélose p. 1 000 ; on répartit à raison de 10 cm³ par tube à essai. On mélange alors par tube la quantité voulue d'antibiotique, avant ou après autoclavage. On ensemence après refroidissement, avec la souche Caron de *B. subtilis* que nous avons utilisée dans une grande partie de nos recherches. On porte

à 37°, et si douze heures plus tard aucun développement n'est observé dans les tubes avec extrait de pollen, alors que les témoins sont recouverts d'un voile bactérien dense, on admet que l'on se trouve au-dessus de la *dilution limite*. Pour le calcul en unités biologiques, on dilue du simple au double une série de tubes. La *dilution limite correspond au double de celle pour laquelle un développement bactérien commence à se produire*. Les pollens des plantes variées manifestent une activité antibiotique bien différente (tableau I).

TABLEAU I.

ESPÈCE	pH DE L'EXTRAIT	RÉSIDU SEC pour 1 g de pollen extrait	UNITÉS par g de pollen
Mais	2,5	0,135	1,85
<i>Castanea</i>	3	0,214	1,1
Pis-enlit	4	0,240	1
Trèfle incarnat	5	0,188	0,9
Ciste	5	0,235	0,1
<i>Erica arborea</i>	5	1,759	0,06

Ces unités antibiotiques se calculent d'après l'expression $U = \frac{1\,000}{C}$ où C correspond à la quantité d'antibiotique en milligrammes (poids sec) nécessaire pour atteindre la dilution limite.

Nous n'avons pas trouvé de principes antibiotiques dans les pollens de trèfle blanc, de coquelicot, de colza, de *Prunus*, de *Salix* ou d'arbres fruitiers.

La substance antibiotique vient-elle des abeilles? — Tous ces pollens ont été non pas récoltés sur les fleurs, mais prélevés devant la ruche à l'aide de l'appareil appelé *trappe à pollen*, qui retient une partie des pollens des butineuses. Or, on sait que les abeilles agglutinent les grains de pollen à l'aide d'une régurgitation gastrique, et l'on n'ignore pas qu'elles y ajoutent ainsi diverses substances, des sucres et des diastases en particulier. On peut se demander alors si les principes antibiotiques ne proviennent pas, en tout ou en partie, des abeilles et non du pollen. A vrai dire, une telle hypothèse est rendue improbable du fait des très grandes différences de pouvoir antibiotique des différents pollens ; il faudrait supposer, fort arbitrairement, que les abeilles régurgitent plus ou moins de substance antibiotique suivant l'espèce de pollen ou même n'en régurgitent pas du tout, puisque certains sont privés de tout pouvoir antibiotique. Mais on peut récolter certains pollens en quantités suffisantes sur les plantes elles-mêmes, en se passant des abeilles : c'est le cas du maïs en particulier, dont nous avons essayé de mesurer alors l'activité antibiotique. Or, le pollen de maïs récolté à la main contient moins d'unités antibiotiques que le pollen des trappes. Il faut donc attribuer, tout au moins en partie, l'activité antibactérienne au pollen lui-même (1 g

d'extrait sec de maïs récolté à la main contient 10,5 unités ; 1 g de ce pollen fournit 31 mg d'extrait sec et contient par gramme 0,3 unité).

EXTRACTION ET PURIFICATION DU PRINCIPE ANTIBIOTIQUE. — Les substances antibiotiques peuvent s'extraire par l'éther, mais on extrait en même temps beaucoup de lipides, ce qui rend impossible une mise en suspension satisfaisante dans le milieu de culture. Il vaut mieux se servir pour l'extraction, de l'alcool absolu ou de l'eau bouillante ; il suffit alors d'une ébullition d'un quart d'heure à reflux pour arracher au pollen la quasi-totalité de ses principes antibiotiques. L'eau froide peut aussi être utilisée, mais il y faut alors une macération de douze heures à la glacière.

Lorsqu'on veut *purifier* l'extrait alcoolique, il est bon de laisser la solution, filtrée au Buchner (qui correspond à 2 cm³ de liquide pour 1 g de pollen) à la glacière pendant vingt-quatre heures. Il se dépose alors un abondant précipité inactif. La solution est concentrée à sec au bain-marie et reprise par l'eau bouillante ; une grande partie passe en solution ou en suspension, mais il reste quelques matières résineuses insolubles qui retiennent encore des traces d'activité antibiotique. La solution a une couleur blanc jaunâtre trouble et s'éclaircit après quelques jours de glacière en laissant déposer un précipité inactif ; si l'on est parti d'une extraction par l'eau bouillante au lieu d'alcool, on peut ajouter à l'eau huit fois le volume d'acétone, ce qui permet de séparer un abondant précipité inactif ; la solution, concentrée à sec, est reprise par l'alcool bouillant, l'alcool évaporé et le résidu repris par l'eau bouillante.

Qu'on ait employé pour l'extraction l'eau ou l'alcool, les liqueurs finales ont la même apparence et une couleur d'un jaune rougeâtre. On peut leur faire subir une purification ultérieure en ajoutant de l'extrait de Saturne jusqu'à cessation du précipité. Les principes actifs restent en solution et, après avoir chassé le plomb en excès par l'acide sulfhydrique, on obtient une liqueur jaune foncé très active. Cette liqueur, chromatographiée sur alumine, fournit une zone jaune foncé éluable par l'ammoniaque, avec au-dessous une zone jaune en contiguïté immédiate et qui descend rapidement quand on ajoute de l'eau sur la colonne. Mais les liqueurs chromatographiées sont inactives, et l'alumine semble détruire ou absorber de manière durable le principe actif. Nous n'avons pu trouver jusqu'ici de matière adsorbante convenable qui fixe le corps antibiotique sans l'altérer. Alors que les solutions initiales sont fortement acides, les extraits purifiés sont neutres.

En procédant exactement de la même façon, on obtient, pour les différents pollens, des liqueurs antibiotiques d'un aspect très analogue, mais d'une activité très différente, comme nous venons de le voir. Jusqu'à plus ample informé, nous pensons qu'il ne s'agit que de différences quantitatives et que les antibiotiques sont les mêmes dans les différents pollens.

ACTIVITÉ DES PRINCIPES ANTIBIOTIQUES SUR DIFFÉRENTES SOUCHES BACTÉRIENNES. — Grâce à l'obligeance de M. Pierre Nicolle, nous avons pu essayer l'activité antibiotique du pollen sur 27 souches bactériennes ;

TABLEAU II.

SOUCHES TESTS		ACTION ANTIBIOTIQUE DE L'EXTRAIT POLLEN							
		2 Cm ³	1 Cm ³	0,5 Cm ³	0,25 Cm ³	0,15 Cm ³	0,10 Cm ³	0,05 Cm ³	Témoin 2 Cm ³ H ₂ O
S. pullorum	N°1	-	-	-	-	+	+	+	+
-	N°136	-	-	-	-	+	+	+	+
-	N°309	-	-	-	-	+ -	+	+	+
S. gallinarum	N°36	-	-	-	-	-	-	+	+
-	N°47	-	-	-	-	+ -	+	+	+
-	N°237	-	-	-	-	+ -	+	+	+
S. Dublin	N°4-54	-	-	+	+	+	+	+	+
-	N°5-54	-	-	+ -	+	+	+	+	+
-	N°7-54	-	-	-	+	+	+	+	+
E. coli 111:B4	Ec 5512	-	-	+	+	+	+	+	+
-	- Ec 539+	-	-	+	+	+	+	+	+
-	- Ec 5470	-	-	+	+	+	+	+	+
-	55:B5 Ec 5401	-	-	+	+	+	+	+	+
-	- Ec 5423	-	-	+	+	+	+	+	+
-	- Ec 5436	-	-	+	+	+	+	+	+
-	26:B6 Ec 543+	-	-	+	+	+	+	+	+
-	- Ec 5449	-	-	+	+	+	+	+	+
-	- Ec 5474	-	-	+	+	+	+	+	+
E. coli 36		-	-	+ -	+	+	+	+	+
-	Bordet	-	-	-	+	+	+	+	+
-	B (Delbrück)	-	-	-	+	+	+	+	+
Proteus vulgaris		-	-	-	-	-	-	+	+
-	X 19	-	-	-	-	-	-	+	+
-	V	-	-	-	-	-	+ -	+	+
B. subtilis Caron		-	-	+ -	+	+	+	+	+
B. pyocyaneus	3	-	-	+ -	+	+	+	+	+
-	4	-	-	+	+	+	+	+	+
-	5	-	-	-	+	+	+	+	+

Les souches tests proviennent de l'Institut Pasteur. En ce qui concerne l'action antibiotique de l'extrait de pollen, le développement bactérien est représenté par le signe + et l'inhibition par le signe —. Les deux signes juxtaposés signifient un développement très lent et presque inexistant. Chaque colonne verticale correspond à une quantité d'extrait (en centimètres cubes) ajoutée au milieu (10 cm³) ; le milieu est simplement de l'eau peptonée (peptone « Rhône-Poulenc ») additionnée de gélose. Les résultats des tests sont nuls ou inversés avec diverses peptones (peptone Merck par exemple).

Remarques : Les 6 premières souches (*S. pullorum* et *S. gallinarum*) ont un développement lent, même les témoins. En ce qui concerne les *E. coli*, avec 0,5 cm³ d'extrait, il y a très peu de développement (sauf Ec 5470 et Ec 5423). *B. subtilis* Caron nous a fourni les mêmes résultats, que l'extrait de pollen soit autoclavé ou non avant l'ensemencement.

la liqueur essayée avait été ajustée à 5 unités-*subtilis* par gramme de résidu sec, soit 100 unités pour 100 cm³ de solution. On notera l'intense activité en ce qui concerne certaines souches de *Proteus* et de *Salmonella*. L'activité est très forte également sur les différentes souches d'*Escherichia*, plus même que le tableau ne le laisserait supposer, car notre méthode de test n'est pas très précise, puisqu'elle va seulement du simple au double, et dans le cas des *Escherichia* les concentrations limites ont été très sévèrement évaluées (la culture bactérienne était vraiment liminaire à la dilution double de la limite dans le cas des *Escherichia*). Ajoutons que nous avons commencé à exécuter des tests par des méthodes plus classiques, à l'aide de disques imbibés d'antibiotiques et introduits dans des cultures en boîtes de Petri; les résultats sont bons, et les auréoles d'inhibition nettes. Nous n'avions pas appliqué cette technique au début de nos recherches, car nos liqueurs d'extraction insuffisamment purifiées étaient souillées de dérivés résineux qui diffusaient mal et irrégulièrement. Rappelons que l'antibiotique du pollen est inactif sur *Staphylococcus aureus*, *S. albus*, *Bacillus alvei* (Chauvin, Defromont, Louveaux, Verge, 1952 [2]).

ACTION CLINIQUE. — Nous avons déjà signalé l'action de l'antibiotique *in vivo*, sur la flore intestinale de la souris. Des essais cliniques, qui se poursuivent encore actuellement et seront publiés ultérieurement, montrent également une action sur certaines affections intestinales de l'homme, telles que des diarrhées tenaces, d'origine basse et résistantes aux antibiotiques courants, et diverses colibacillooses.

Nous tenons en terminant à remercier tout particulièrement M. Pierre Nicolle, Chef de Service à l'Institut Pasteur, qui nous a aidés de ses conseils au cours de ce travail et a bien voulu en revoir la rédaction.

BIBLIOGRAPHIE

- [1] R. L. SMITH, I. V. BECK et E. J. ANDERSON. *J. Bact.*, **57**, 213-218.
- [2] R. CHAUVIN, C. DEFROMONT, J. LOUVEAUX et J. VERGÉ. *C. R. Soc. Biol.*, 1952, **146**, 645.

AGGLUTINATION COMPARÉE DES HÉMATIES DE LA POULE, DU CHAMEAU ET DES ÉQUIDÉS PAR LES VIRUS DE LA MALADIE DE NEWCASTLE ET DE LA PESTE AVIAIRE

par L. PLACIDI et J. SANTUCCI.

(*Institut de Biologie Animale. Rabat, Maroc*)

Nous avons utilisé dans ces essais des souches marocaines, deux souches françaises (Var et Vitry) et une souche italienne (Brescia), de virus de Newcastle, entretenues par passage sur l'embryon de poulet.

La souche de peste aviaire est une souche italienne (Brescia) conservée selon le même procédé. Nous avons opéré selon la technique habituelle (suspension d'hématies à 0,5 p. 100 en eau physiologique tamponnée à pH 7 : 0,5 ml ; liquide allantoïque : 0,5 ml ; concentration finale : 0,25 p. 100 ; hématies centrifugées au préalable pendant dix minutes à 1 500 tours).

Le tableau I montre les résultats de l'observation comparée d'une agglutination sur lame de quelques espèces globulaires par le virus de Newcastle (liquide allantoïque brut).

TABLEAU I. — Agglutination par le virus de Newcastle.

ESPÈCES GLOBULAIRES	SOUCHES MAROCAINES		S. BRESCIA	S. VAR	S. VITRY
	n° 1	n° 2			
Poule	+	+	+	+	+
Chameau	+	+	+	+	+
Cheval	—	—	—	—	—
Ane	—	—	—	—	—
Mulet	—	—	—	—	—

Le tableau II montre les taux d'agglutination de ces mêmes espèces globulaires obtenus avec un virus de Newcastle (souche marocaine) et un virus de peste aviaire (Brescia).

En ce qui concerne spécialement les hématies de chameau, nous avons prolongé l'essai avec 11 souches marocaines : les résultats permettent de constater que l'agglutination se produit avec les deux virus ; mais tandis que, pour la peste, la différence est insensible entre les hématies de poulet et celles du chameau, les taux d'agglutination

TABLEAU II.

VIRUS	POULET	CHEVAL	ÂNE	MULET	CHAMEAU
Virus de Newcastle	640 + 280 ±	0	0	0	30 +
Virus de la peste aviaire	40 +	40 + 80 ±	40 + 8 ±	40 +	40 +

sont deux à quatre fois plus élevés, pour les premières que pour celles du chameau, dans le cas du virus de Newcastle.

Enfin, nos essais confirment que les globules d'équidés, qui ne sont pas agglutinés par le virus de Newcastle, le sont par celui de la peste aviaire, constatation proposée déjà [4] comme test de différenciation des deux virus, mais rarement notée par les auteurs.

BIBLIOGRAPHIE

- [4] M. M. KAPLAN. *Newcastle disease*, F. A. C. Agricultural studies, n° 10. Washington, décembre 1949, p. 167.

Les communications suivantes paraîtront en *Mémoire* dans les *Annales de l'Institut Pasteur* :

Etudes sur le collagène. VI. De l'action exercée par des anti-toxines et des polyosides bactériens sur des solutions de collagène A, par S. BAZIN, A. DELAUNAY et M. HÉNON.

Contribution à l'étude de la physiologie bactérienne. Virulence et équipement enzymatique des bactéries, par J. DESBORDES, E. FOURNIER, E. ROSENBERG et D. ALIX.

Etude des modifications de la flore intestinale aérobie du nourrisson et du jeune enfant sous l'influence des antibiotiques, par G. MOUSTARDIER, J. BENTEGEAT et P. LE NOC.

Sur la distinction entre *Salmonella gallinarum* et *Salmonella pullorum* et leurs variantes biochimiques, par P. GORET, L. JOUBERT et J. OUDAT.

Dosage de l'antigène O au cours de la conservation de quelques souches de *S. typhi* en divers milieux, par R. COMBES, A.-M. STAUB et L. LE MINOR.

LIVRES REÇUS

Houben-Weyl. — *Methoden der organischen Chemie*. 4^e édit. complètement remise à jour. Vol. IX : Dérivés du soufre, du sélénium et du tellure. 1 vol., 1337 p., 9 fig., 89 tableaux. Georg Thieme, édit., Stuttgart, 1955. Prix : 218 DM.

Le tome IX des *Methoden der organischen Chemie* traite des dérivés organiques du soufre, du sélénium et du tellure. Dans l'édition actuelle, les dérivés du soufre occupent à eux seuls 900 pages (contre 130 dans l'édition précédente) et ceux du sélénium et du tellure, 300 pages, alors qu'ils étaient simplement mentionnés dans la 3^e édition.

Les dérivés soufrés sont classés selon le degré d'oxydation croissant de l'atome de soufre. Les articles qui leur sont consacrés fournissent au lecteur une vue d'ensemble claire et complète d'un sujet extrêmement complexe, en même temps que des techniques de laboratoire d'autant plus précieuses qu'il s'agit d'une chimie hérissée de difficultés expérimentales.

La chimie des composés du sélénium et du tellure est beaucoup moins connue que celle des dérivés soufrés. Les études systématiques y sont plus rares, encore que le nombre de corps synthétisés soit plus important qu'on ne le pense généralement. Jusqu'à présent, les techniques de préparation et de transformation de ces corps étaient dispersées dans les diverses publications chimiques. Les voilà réunies dans un chapitre qui marque un heureux effort de clarification dans un domaine que peu d'organiciens connaissent bien.

Cet ouvrage vient à son heure : il comble une lacune dans le domaine de la chimie organique du sélénium et du tellure, mais il est surtout destiné à devenir rapidement un instrument de travail indispensable à ceux qui, de jour en jour plus nombreux, s'intéressent aux organo-soufrés dont l'importance ne cesse de croître, tant en biochimie qu'en chimie pharmaceutique et en chimie industrielle.

P. K.

K. A. Bisset. — *The cytology and life-history of bacteria*. 2^e édit., 1 vol., 164 p., 68 fig., E. et S. Livingstone édit., Edimbourg et Londres 1955. Prix : 25 shillings.

La seconde édition de cette monographie contient de nombreux chapitres que ne comportait pas la première, parue en 1949, les études sur la structure cytologique des bactéries ayant fait des progrès considérables au cours de ces six années. La question de la reproduction sexuée, de la réduction nucléaire, du développement des flagelles, la formation de la membrane cellulaire et surtout la génétique des bactéries sont étudiées de façon bien plus approfondie que dans la première édition. Un dernier chapitre envisage l'évolution des bactéries qui, comme les autres organismes vivants, semblent avoir passé par un mode de vie aquatique pour s'adapter secondairement à la vie terrestre. Le livre

est richement illustré de très belles photographies au microscope optique, électronique et à contraste de phase, ainsi que de nombreux schémas, chaque chapitre comportant sa bibliographie.

H. T.

Les gamma-globulines et la médecine des enfants. Séminaire organisé à Paris, du 2 au 4 décembre 1954, par le Centre International de l'Enfance, sous la présidence du professeur A. Tiselius. Centre International de l'Enfance, travaux et documents, vol. IX. 1 vol., 298 p., Masson et C^{ie}, édit., Paris, 1955. Prix : 2.000 fr.

De nombreux collaborateurs se sont réunis pour la rédaction de cet ouvrage, qui envisage successivement les problèmes théoriques et pratiques posés par les gamma-globulines (caractères physico-chimiques, étude immunologique), leur origine et leur métabolisme, leur pathologie et enfin leur application dans le traitement des diverses maladies infectieuses de l'enfance, en particulier rougeole, rubéole, fièvre typhoïde, etc. Les diverses communications sont accompagnées des discussions qui les ont suivies.

H. T.

V. Reynes. — *Précis d'épidémiologie et prophylaxie des grandes épidémies tropicales.* 3^e édition revue et augmentée. 1 vol., 418 p., 57 fig., Masson, édit., Paris, 1955. Prix : 2 800 fr.

Il s'agit de la 3^e édition de ce volume, dont la première avait paru en 1950, qui a été remise à jour et complétée par divers chapitres tenant compte des connaissances acquises au cours de ces cinq dernières années.

Après l'étude de la « chaîne épidémiologique », qui envisage l'existence d'un agent pathogène, d'un mode de transmission adéquat, d'un terrain réceptif et des causes favorisantes, l'auteur aborde le rôle des arthropodes : de très nombreuses maladies sont transmises à l'homme par des insectes ou des acariens ; la biologie de ceux-ci et les modalités de survie des virus dans leur organisme sont étudiées en détail. La seconde partie passe en revue les maladies à transmission fluggiennne (pneumococcies, méningococcies), la troisième partie, les maladies d'origine fécale (fièvres typhiques et paratyphiques, dysenterie, choléra, hépatites, poliomyélite, leptospiroses). Puis viennent les infections transmises par les arthropodes (paludisme, fièvre jaune, leishmaniose, trypanosomiase, peste, fièvre récurrente, rickettsioses, et leurs vecteurs : insectes, acariens, rat). Après une étude des helminthiases, diverses affections sont passées en revue : tuberculose, lèpre, bérubéri.

Un index alphabétique des matières permet de retrouver aisément le sujet cherché et une table détaillée indique les divers aspects étudiés.

H. T.

G. W. Harris. — *Neural control of the pituitary gland.* 1 vol., 298 p., 54 fig., E. Arnold, édit., Londres, 1955. Prix : 30 shillings.

Ce livre reproduit une série de conférences faites par l'auteur au Cours de Physiologie de l'Université de Cambridge. Il s'adresse aux

physiologistes et aux spécialistes des différentes disciplines qui s'intéressent aux divers aspects de la physiologie. Il est divisé en 13 chapitres qui envisagent successivement les effets du système nerveux sur l'activité endocrine et ceux des sécrétions des glandes closes sur le système nerveux, l'anatomie de l'hypophyse, les essais de transplantation de la glande, l'effet des hormones hypophysaires antérieures (activité thyroïdienne, hormones de lactation et de croissance), le contrôle neuro-vasculaire de l'adénohypophyse, l'anatomie de l'hypothalamus, la nature et le lieu de formation de l'hormone post-hypophysaire et l'effet des hormones en général sur le comportement. Une courte bibliographie accompagne chaque chapitre.

H. T.

G. MacFarlane et R. Biggs. — *The diagnosis and treatment of haemophilia and its related conditions*. Medical Research Council, Memorandum n° 32, 1 opuscule, 23 p., H. M. S. Stationery Office, Londres, édit., 1955. Prix : 2 s. 6 d.

On sait que la tendance aux hémorragies est due à une rupture dans la chaîne des réactions du système de coagulation du sang. Ce système est très complexe et comprend en tout neuf facteurs. Le terme d'hémophilie vraie doit être réservé à l'affection qui est provoquée par l'absence du facteur dénommé globuline antihémolytique. L'absence d'autres facteurs (*Christmas factor*, facteur V, facteur VII) peut également entraîner des manifestations cliniques semblables à celles de l'hémophilie ; mais, dans le cas des facteurs V et VII tout au moins, l'hérédité n'est pas liée au sexe. Le présent opuscule a pour but de permettre le diagnostic différentiel (en clinique et au laboratoire) entre ces différents états pathologiques et de donner quelques indications en ce qui concerne leur traitement.

H. T.

Ciba Foundation Symposium. *Experimental Tuberculosis. Bacillus and host ; with an addendum on Leprosy*. 1 vol., 396 p., 69 fig., J. et A. Churchill, édit., Londres, 1955. Prix : 42 shillings.

A ce Symposium ont été étudiées, entre autres, les questions suivantes : les protéines du bacille tuberculeux, structure et activité des acides mycoliques, la mycobactine, les constituants polysaccharidiques du bacille, les réactions des tissus au bacille et à ses produits, l'activité sérologique des diverses fractions des filtrats de culture, les B. K. comme antigènes dans l'immunité, l'allergie tuberculeuse, l'action de la cortisone, le mécanisme de l'immunité dans la tuberculose, les réactions des poumons chez les tuberculeux à la suite de la chimiothérapie, etc.

Quatre chapitres ont été ajoutés, concernant la lèpre.

Chacune des communications est, comme toujours, accompagnée des discussions qui l'ont suivie et d'une bibliographie.

H. T.

Le Gérant : G. MASSON.